

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 292**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2008 PCT/US2008/011932**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2009 WO09051837**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2008 E 08839738 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2217269**

54 Título: **Nanotecnología de vacunas**

30 Prioridad:

12.10.2007 US 979596 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.07.2017

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY (25.0%)
77 MASSACHUSETTS AVENUE
CAMBRIDGE, MA 02139, US;
PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE (25.0%);
THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC. (25.0%) y
THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION (25.0%)**

72 Inventor/es:

**VON ANDRIAN, ULRICH, H.;
FAROKHZAD, OMID, C.;
LANGER, ROBERT, S.;
JUNT, TOBIAS;
MOSEMAN, ELLIOTT ASHLEY;
ZHANG, LIANGFANG;
BASTO, PAMELA;
IANNACONE, MATTEO y
ALEXIS, FRANK**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 627 292 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

Nanotecnología de vacunas

5 Respaldo gubernamental

El Gobierno de los Estados Unidos ha proporcionado un importante respaldo económico utilizado en el desarrollo de la presente invención. En particular, el National Institutes of Health (números de contrato AI069259, AI072252, CA119349, y HL56949) y los National Institutes of Health/National Institute of Biomedical Imaging and BioEngineering (número de contrato EB 003647) han financiado el desarrollo de la presente invención. El Gobierno de Estados Unidos tiene algunos derechos sobre la invención.

Antecedentes de la invención

Muchas vacunas actuales contra patógenos microbianos comprenden cepas atenuadas vivas o no virulentas de los microorganismos causantes. Muchas vacunas comprenden microorganismos muertos o inactivados de otra forma. Otras vacunas utilizan componentes purificados de lisados de patógenos, tales como hidratos de carbono superficiales o proteínas recombinantes derivadas de patógenos. Las vacunas que utilizan patógenos vivos atenuados o inactivados dan como resultado normalmente una respuesta inmunitaria intensa, pero su uso tiene limitaciones. Por ejemplo, las cepas vivas de la vacuna pueden producir algunas veces patologías infecciosas, especialmente cuando se administran a receptores inmunocomprometidos. Además, muchos patógenos, particularmente virus, experimentan mutaciones rápidas continuas en su genoma, que les permiten escapar a las respuestas inmunitarias de cepas de vacunas antigénicamente distintas.

Dada la dificultad del desarrollo de vacunas, muchas vacunas tienen un suministro extremadamente corto. Por ejemplo, en octubre de 2007, que son vacunas de la gripe, varicela y hepatitis A que escasean en los Estados Unidos. En algunos casos, la escasez de vacunas se produce debido a que no hay suficientes fabricantes que dediquen sus instalaciones a la producción de vacunas para satisfacer la demanda. En algunos casos, la escasez de vacunas se atribuye a una baja potencia de las vacunas, lo que significa que debe administrarse una gran cantidad de productos de vacunas a cada individuo a fin de conseguir un efecto profiláctico. Por ejemplo, algunas vacunas no se pueden administrar como un organismo intacto (incluso si está atenuado o muerto) debido a que producen patologías infecciosas. En su lugar, dichas vacunas comprenden usualmente componentes de patógenos purificados, que conducen normalmente a respuestas inmunitarias mucho menos potentes.

El documento WO-A-2007/098254 divulga nanopartículas poliméricas que se dirigen a los APC de los ganglios linfáticos y activan el complemento.

De este modo, existe una necesidad en la técnica de sistemas y métodos para producir vacunas eficaces muy inmunógenas. Existe también una necesidad de composiciones de vacunas mejoradas que puedan inducir potencialmente respuestas inmunitarias prolongadas. Para el tratamiento y la prevención de enfermedades infecciosas, existe una necesidad de composiciones de vacunas mejoradas que sea muy inmunógenas pero que no produzcan enfermedad.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención proporciona nanotransportadores que tienen un diámetro medio geométrico comprendido entre 50 nm y 500 nm, siendo los nanotransportadores poliméricos, y comprendiendo un antígeno peptídico de linfocitos B, y un agente inmunoestimulador; en el que el agente inmunoestimulador es un agonista del receptor de tipo toll;

en el que los nanotransportadores comprenden un polímero seleccionado entre el grupo que consiste en: poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) y poli(ácido láctico/ácido glicólico) (PLGA); y,

en el que el agente inmunoestimulador está unido covalentemente a los nanotransportadores o a un polímero a partir del que se forman los nanotransportadores, y el antígeno peptídico de linfocitos B está encapsulado.

La invención proporciona también un método para fabricar los nanotransportadores como se define en las reivindicaciones mediante nanoprecipitación, centrado de flujo usando canales de fluido, secado por pulverización, evaporación en disolvente mediante emulsión única y doble, o extracción con disolventes.

La invención también proporciona los nanotransportadores que se definen en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de un individuo que lo necesita provocando una respuesta inmunitaria.

La invención también proporciona nanotransportadores como se definen en las reivindicaciones para su uso en la redirección del sistema inmunitario desde una respuesta Th1 a una respuesta Th2. Los nanotransportadores sintéticos comprenden uno o más de un agente inmunomodulador, un agente inmunoestimulador, y un agente de direccionamiento (denominado también en el presente documento como "resto de direccionamiento"). El agente inmunomodulador induce una respuesta inmunitaria en linfocitos B y/o T. El agente de direccionamiento reconoce

una o más dianas asociadas con un órgano, tejido, célula, y/o local subcelular. Los nanotransportadores son útiles en preparaciones y kits farmacéuticos para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades, trastornos, o dolencias susceptibles de tratamiento mediante la modulación del sistema inmunitario. Dichas dolencias incluyen aquellas enfermedades, trastornos, o dolencias modificadas mediante la potenciación de la respuesta inmunitaria de forma específica o no específica, o dirigiendo/redirigiendo la respuesta inmunitaria de forma específica o no específica.

Como apreciarán los expertos en la materia, la modulación del sistema inmunitario es útil, entre otras cosas, con respecto a los tratamientos médicos, tal como, por ejemplo, para la profilaxis y/o el tratamiento de las enfermedades infecciosas, cáncer, alergia, asma (incluyendo asma alérgica), enfermedad autoinmunitaria (incluyendo la artritis reumatoide), inmunización frente a sustancias adictivas, e inmunización frente a sustancias con peligro biológico y otras sustancias tóxicas. La modulación del sistema inmunitario también es útil como herramienta en escenarios industriales y de investigación académica, tal como, por ejemplo, para inmunizar un animal para producir anticuerpos.

Un aspecto de la invención es el suministro de vacunas. Una vacuna de acuerdo con la invención contiene un antígeno. Dichos nanotransportadores que transportan por sí mismos un antígeno se incluyen en la categoría referida a continuación como nanotransportadores de vacunas. el nanotransportador tiene unido al mismo un agente inmunoestimulador para potenciar, dirigir, o redirigir una respuesta inmunitaria, preferentemente a un antígeno. El antígeno puede mezclarse con la preparación de un nanotransportador unido a agente al cual el agente inmunoestimulador se une para formar la vacuna. Las preparaciones de la invención incluirán en muchos casos uno o más nanotransportadores. En algunas realizaciones, la preparación incluye un nanotransportador unido a uno o más, pero no todos, de un agente inmunomodulador, un agente inmunoestimulador, y un agente de direccionamiento. Las preparaciones pueden ser igualmente una de nanotransportadores, en el que cada nanotransportador tiene unido al mismo un agente inmunomodulador, el agente inmunoestimulador, y un agente de direccionamiento. En este caso, los propios nanotransportadores, aparte de los agentes que administran, pueden ser iguales o diferentes.

Importante es el descubrimiento de que los nanotransportadores de la invención son potentes para estimular el sistema inmunitario. Importante es el descubrimiento de que los nanotransportadores pueden adaptarse para imitar, y desde un punto de vista inmunológico, mejorar, lo que el sistema inmunitario 've' cuando se expone a antígenos en la naturaleza o en la tecnología de vacunas anterior. A este respecto, se ha descubierto de forma inesperada que la actividad de los adyuvantes puede potenciarse marcadamente si se unen covalentemente a nanotransportadores. Se ha descubierto también de forma inesperada que los nanotransportadores pueden ayudar a dirigir un agente inmunoestimulador a células inmunitarias adecuadas incluso sin un agente de direccionamiento.

Los sistemas descritos en el presente documento permiten la manipulación de los parámetros que afectan al sistema inmunitario de una manera que da como resultado una modulación inmunitaria mejorada. Un aspecto importante de la invención es que los nanotransportadores pueden controlarse en términos de tamaño, densidad del agente, grado y localización del direccionamiento, degradación, liberación del agente, etc. Varios aspectos de la invención consiguen uno o más de estos beneficios, como se describe en más detalle más adelante. En particular, se describen a continuación preparaciones inmunomoduladoras, componentes nanotransportadores sintéticos de dichas preparaciones, nanotransportadores específicos y preferidos, agentes inmunomoduladores, inmunoestimuladores, y de direccionamiento específicos y preferidos, partes de componentes y bloques de construcción de nanotransportadores de la invención, así como métodos para fabricar dichos nanotransportadores, incluyendo un método preferido que implica el autoensamblado de nanotransportadores. Además, se describen preparaciones y sistemas para generar una modulación inmunitaria sólida vinculada con antígenos débiles y antígenos no reconocidos por linfocitos T. En algunos aspectos, se proporciona una composición que comprende un nanotransportador (por ejemplo, una que se dirige a un órgano, tejido, célula, o local subcelular). En algunas realizaciones, el nanotransportador se dirige a uno o más tejidos u órganos linfoides secundarios. En algunas realizaciones, los tejidos u órganos linfoides secundarios son los ganglios linfáticos, bazo, las placas de Peyer, el apéndice, o las amígdalas.

La estructura del nanotransportador comprende moléculas de polímeros. Los nanotransportadores son nanopartículas poliméricas y/o nanopartículas que se desarrollan utilizando una combinación de nanomateriales tales como nanopartículas de polímeros lipídicos.

El nanotransportador comprende uno o más polímeros.

En algunas realizaciones, el nanotransportador se forma mediante autoensamblado. El autoensamblado se refiere al proceso de la formación de un nanotransportador utilizando componentes que se orientarán ellos mismos de una manera previsible formando nanotransportadores de una forma previsible y reproducible. En algunas realizaciones, los nanotransportadores se forman utilizando biomateriales anfífilicos que se orientarán ellos mismos entre sí para formar nanotransportadores de dimensión previsible, constituyentes, y la colocación de constituyentes. Según la invención, los biomateriales anfífilicos pueden tener unidos a los mismos agentes inmunomoduladores, agentes inmunoestimuladores y/o agentes de direccionamiento de tal manera que cuando los nanotransportadores se autoensamblan, existe un modelo de localización y densidad de los agentes sobre/en el nanotransportador

reproducibile.

En algunas realizaciones, el nanotransportador tiene un potencial zeta positivo. En algunas realizaciones, el nanotransportador tiene una carga positiva neta a pH neutro. En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende uno o más restos amina en su superficie. En algunas realizaciones, el resto amina es una amina primaria, secundaria, terciaria, o cuaternaria. En algunas realizaciones, el resto amina es una amina alifática. En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende un polímero que contiene aminas. En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende un lípido que contiene aminas. En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende una proteína o un péptido que está cargado positivamente a pH neutro. En algunas realizaciones, el nanotransportador con el uno o más restos amina sobre su superficie tiene una carga positiva neta a pH neutro.

Los nanotransportadores tienen un diámetro geométrico medio que es mayor de 50 nm pero menor de 500 nm. En algunas realizaciones, el diámetro geométrico medio de una población de nanotransportadores es aproximadamente 60 nm, 75 nm, 100 nm, 125 nm, 150 nm, 175 nm, 200 nm, 225 nm, 250 nm, 275 nm, 300 nm, 325 nm, 350 nm, 375 nm, 400 nm, 425 nm, 450 nm, o 475 nm. En algunas realizaciones, el diámetro geométrico medio está entre 100-400 nm, 100-300 nm, 100-250 nm, o 100-200 nm. En algunas realizaciones, el diámetro geométrico medio está entre 60-400 nm, 60-350 nm, 60-300 nm, 60-250 nm, o 60-200 nm. En algunas realizaciones, el diámetro geométrico medio está entre 75-250 nm. En algunas realizaciones, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, el 90 % o más de los nanotransportadores de una población de nanotransportadores tiene un diámetro que es mayor de 50 nm pero menor de 500 nm. En algunas realizaciones, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, el 90 % o más de los nanotransportadores de una población de nanotransportadores tiene un diámetro de aproximadamente 60 nm, 75 nm, 100 nm, 125 nm, 150 nm, 175 nm, 200 nm, 225 nm, 250 nm, 275 nm, 300 nm, 325 nm, 350 nm, 375 nm, 400 nm, 425 nm, 450 nm, o 475 nm. En algunas realizaciones, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, el 90 % o más de los nanotransportadores de una población de nanotransportadores tiene un diámetro que está entre 100-400 nm, 100-300 nm, 100-250 nm, o 100-200 nm. En algunas realizaciones, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, el 90 % o más de los nanotransportadores de una población de nanotransportadores tiene un diámetro que está entre 60-400 nm, 60-350 nm, 60-300 nm, 60-250 nm, o 60-200 nm.

El nanotransportador proporcionado en el presente documento se puede usar para modular una respuesta inmunitaria (por ejemplo, potenciar, dirigir, o redirigir) y comprende además un agente inmunomodulador y/o un agente de direccionamiento.

El nanotransportador comprende un antígeno peptídico de linfocitos B. El antígeno de linfocitos B está encapsulado en el interior del nanotransportador, y también puede estar sobre la superficie del nanotransportador. En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos B está sobre la superficie del nanotransportador a una densidad que activa los receptores de los linfocitos B. En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende además un resto de direccionamiento. Un antígeno de linfocitos B incluye: antígenos poco inmunógenos, moléculas pequeñas, moléculas que producen dependencia, y toxinas (la toxina para su inclusión en un nanotransportador puede ser la molécula completa o una parte de la misma). En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos B no es un antígeno de linfocitos T. En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos B es un antígeno de enfermedad degenerativa, un antígeno de enfermedad infecciosa, un antígeno de cáncer, un antígeno de enfermedad atópica, un antígeno de enfermedad autoinmunitaria, un aloantígeno, un xenoantígeno, un alérgeno, una sustancia adictiva, o una enzima de enfermedad metabólica o un producto enzimático.

Un alérgeno se refiere a una sustancia (antígeno) que puede inducir una respuesta alérgica en un sujeto susceptible. La lista de alérgenos es enorme e incluye pólenes, venenos de insectos, polvo de caspa de animales, esporas y fármacos fúngicos (por ejemplo, penicilina). Los alérgenos incluyen también alérgenos alimentarios.

En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende además un antígeno de linfocitos T. En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos T está sobre la superficie del nanotransportador, encapsulado en el nanotransportador, o ambos. En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos T está asociado con el nanotransportador. En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos T está asociado covalentemente con el nanotransportador. En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos T no está asociado covalentemente con el nanotransportador. En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno de enfermedad degenerativa, un antígeno de enfermedad infecciosa, un antígeno de cáncer, un antígeno de enfermedad atópica, un antígeno de enfermedad autoinmunitaria, un aloantígeno, un xenoantígeno, un alérgeno, una sustancia adictiva, o una enzima de enfermedad metabólica o un producto enzimático. En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos T es un antígeno de linfocitos T 'universal' (es decir, uno que se puede usar con un antígeno de linfocitos T no relacionado, incluyendo un hidrato de carbono, para estimular los linfocitos T auxiliares). En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende además un resto de direccionamiento.

En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende un antígeno de linfocitos B y un antígeno de linfocitos T. En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos B y el antígeno de linfocitos T son antígenos diferentes. En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos B y el antígeno de linfocitos T son el mismo antígeno. En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos B está sobre la superficie del nanotransportador (por ejemplo, asociado de forma covalente o no covalente) como encapsulado en el nanotransportador, mientras que el antígeno de linfocitos T

está sobre la superficie del nanotransportador (por ejemplo, asociado de forma covalente o no covalente), está encapsulado dentro del nanotransportador, o está tanto sobre la superficie del nanotransportador (por ejemplo, asociado de forma covalente o no covalente) como encapsulado en el nanotransportador (por ejemplo, asociado de forma covalente o no covalente).

5 En algunas realizaciones, el agente inmunoestimulador está sobre la superficie del nanotransportador y está encapsulado en el nanotransportador. En algunas realizaciones, el agente inmunoestimulador está tanto sobre la superficie del nanotransportador como encapsulado en el nanotransportador. En algunas realizaciones, el agente inmunoestimulador sobre la superficie del nanotransportador es diferente del agente inmunoestimulador encapsulado en el nanotransportador. En algunas realizaciones, el agente inmunoestimulador sobre la superficie y encapsulado en el nanotransportador es el mismo.

En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende más de una especie de agentes inmunoestimuladores, en cuyo caso, los agentes inmunoestimuladores son diferentes.

15 El nanotransportador, en algunas realizaciones, se puede usar para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria a un antígeno poco inmunógeno en un sujeto. En algunas realizaciones, el nanotransportador se puede usar para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria contra una sustancia adictiva en un sujeto. En algunas realizaciones, el nanotransportador se puede usar para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria contra una toxina en un sujeto.

20 El nanotransportador, en algunas realizaciones, se puede usar para tratar a un sujeto que tiene o es susceptible a una adicción. El nanotransportador, en algunas realizaciones, se puede usar para tratar a un sujeto que ha estado o estará expuesto a una toxina. En algunas realizaciones, el nanotransportador se puede usar para tratar y/o prevenir una enfermedad infecciosa, cáncer, alergia, asma (incluyendo asma alérgica), o una enfermedad autoinmunitaria (incluyendo artritis reumatoide). En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende un resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento está sobre la superficie del nanotransportador. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento está asociado con el nanotransportador. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento está asociado covalentemente con el nanotransportador. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento no está asociado covalentemente con el nanotransportador.

30 En algunos aspectos, se proporciona una composición que comprende un nanotransportador que comprende (a) un conjugado de un polímero y un antígeno, (b) un conjugado de un polímero y un agente inmunoestimulador, y (c) un conjugado de un polímero y un resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende un conjugado de un polímero y un antígeno y un conjugado de un polímero y un agente inmunoestimulador. En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende un conjugado de un polímero y un antígeno y un conjugado de un polímero y un resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende un conjugado de un polímero y un agente inmunoestimulador y un conjugado de un polímero y un resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, el conjugado o conjugados es/son un conjugado/conjugados covalente/s o un conjugado/conjugados no covalente/s o cualquiera de sus combinaciones. El antígeno es un antígeno peptídico de linfocitos B. En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende además un conjugado de un polímero y un antígeno de linfocitos T. En algunas realizaciones, dicho conjugado es un conjugado covalente o no covalente. En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende además un conjugado de un polímero y un antígeno de linfocitos B. En algunas realizaciones, dicho conjugado es un conjugado covalente o no covalente.

En algunos aspectos, se proporciona una composición que comprende un nanotransportador que comprende una molécula o moléculas de la siguiente fórmula X-L1-Y-L2-Z, en la que X es un polímero biodegradable, Y es un polímero no adhesivo soluble en agua, Z es un resto de direccionamiento, un agente inmunomodulador, un agente inmunoestimulador, o un agente farmacéutico, y L1 y L2 son enlaces o moléculas enlazadoras, en las que tanto Y como Z pero no ambas, pueden estar ausentes. El nanotransportador comprende un antígeno y un agente inmunoestimulador. Los antígenos incluyen un antígeno de una enfermedad degenerativa, un antígeno de enfermedad infecciosa, un antígeno de cáncer, un antígeno de enfermedad atópica, un antígeno de enfermedad autoinmunitaria, un aloantígeno, un xenoantígeno, un alérgeno, una sustancia adictiva, o una enzima de enfermedad metabólica o un producto enzimático. Z puede ser cualquier antígeno descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, Z es un resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, Z es un resto de direccionamiento que se une a un receptor expresado sobre la superficie de una célula. En algunas realizaciones, Z es un resto de direccionamiento que se une a un receptor soluble. En algunas realizaciones, el receptor soluble es una proteína del complemento o un anticuerpo preexistente. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento es para la administración del nanotransportador a las células presentadoras de antígeno, linfocitos T o linfocitos B. En algunas realizaciones, las células presentadoras de antígeno son células dendríticas (DC, *dendritic cells*), células dendríticas foliculares (FDC), o macrófagos. En algunas realizaciones, los macrófagos son macrófagos del seno subcapsular (SCS-Mph). En algunas realizaciones, la Y es PEG o PEO. En algunas realizaciones, Y es polialquilenglicol, y óxido de polialquileño. X es PLGA, PLA o PGA. En algunas realizaciones, Z está ausente.

65 En algunos aspectos, se proporciona una composición que comprende un nanotransportador que comprende un

agente inmunoestimulador. En algunas realizaciones, la composición comprende además un antígeno y/o un resto de direccionamiento. En algunos aspectos, se proporciona una composición que comprende un nanotransportador que comprende una molécula pequeña, un agente inmunoestimulador, y un antígeno de linfocitos T. En algunas realizaciones, la molécula pequeña está sobre la superficie del nanotransportador o está sobre la superficie del nanotransportador y encapsulada en el nanotransportador. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es una sustancia adictiva. En algunas realizaciones, la sustancia adictiva es nicotina. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es una toxina. En algunas realizaciones, la toxina es para un arma química, un agente de un arma biológica, o un agente peligroso para el medio ambiente. En algunas realizaciones, la molécula pequeña se conjuga con un polímero. En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende además un resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento se conjuga con un polímero.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende un nanotransportador que comprende nicotina, un agente inmunoestimulador, un antígeno de linfocitos T, y un resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, el agente inmunoestimulador es un agonista de TLR 7/8. En algunas realizaciones, el agente inmunoestimulador es R848 o CL097 o imiquimod. En algunas realizaciones, la nicotina está sobre la superficie del nanotransportador o está tanto sobre la superficie del nanotransportador como encapsulada en el nanotransportador. En algunas realizaciones, la nicotina se conjuga con un polímero, preferentemente, se conjuga de forma covalente. En algunas realizaciones, el agente inmunoestimulador está sobre la superficie del nanotransportador o tanto sobre la superficie del nanotransportador como encapsulado en el nanotransportador. El agente inmunoestimulador se conjuga con un polímero. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento se conjuga con un polímero. El polímero biodegradable es PLGA, PLA, o PGA. En alguna de estas realizaciones, el agente inmunoestimulador es R848 o un antagonista de TLR9 (por ejemplo, un ácido nucleico que contiene CpG/CpG). Dichos nanotransportadores, en algunas realizaciones, se pueden usar para activar linfocitos T CD4 y/o linfocitos T CD8. En algunas realizaciones, el agente inmunoestimulador, por ejemplo, un agonista de R848 o TLR9, está conjugado a un polímero. La conjugación es covalente. En algunas realizaciones, el polímero es PLA. En cualquiera de estas realizaciones, el nanotransportador puede comprender además un antígeno de linfocitos T.

En algunos aspectos, se proporciona una composición que comprende un nanotransportador que comprende un antígeno poco inmunógeno, un agente inmunoestimulador, y un antígeno de linfocitos T. En algunas realizaciones, el antígeno poco inmunógeno está sobre la superficie del nanotransportador o está tanto sobre la superficie del nanotransportador como encapsulado en el nanotransportador. En algunas realizaciones, el antígeno poco inmunógeno es una molécula pequeña o un hidrato de carbono. En algunas realizaciones, el antígeno poco inmunógeno es una sustancia adictiva. En algunas realizaciones, el antígeno poco inmunógeno es una toxina. En algunas realizaciones, el antígeno poco inmunógeno está conjugado covalentemente con un polímero. En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende además un resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento está conjugado covalentemente con un polímero. En algunos aspectos, se proporciona una composición que comprende un nanotransportador que se dirige a una célula, tejido u órgano específico y modula una respuesta inmunitaria que comprende un antígeno de linfocitos B sobre su superficie a una densidad que activa los linfocitos B y un agente inmunoestimulador. En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende además un resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica y comprende además un transportador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una composición de vacuna.

En algunos aspectos, una composición, tal como una composición farmacéutica que comprende un resto de direccionamiento de células presentadoras de antígenos y un nanotransportador. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento de células presentadoras de antígenos y el nanotransportador están conjugados. En algunas realizaciones, el conjugado es un conjugado covalente. En algunas realizaciones, el conjugado es un conjugado no covalente.

En algunos aspectos, una composición, tal como una composición farmacéutica que comprende un agente inmunoestimulador y un nanotransportador.

El antígeno de linfocitos B es una proteína o péptido. En algunas realizaciones, la proteína o péptido es de un agente infeccioso. En algunas realizaciones, el agente infeccioso es una bacteria, hongo, virus, protozoo, o parásito. En algunas realizaciones, el virus es un virus de la viruela, el virus de la viruela, virus del Ébola, virus de Marburg, el virus del dengue, virus de la gripe, virus paragripal, virus respiratorio sincitial, virus de la rubéola, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del papiloma humano, el virus de la varicela-zóster, virus del herpes simple, el citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, JC virus, rabdovirus, rotavirus, rinovirus, el adenovirus, virus del papiloma, parvovirus, picornavirus, el poliovirus, virus que producen paperas, virus que producen rabia, reovirus, el virus de la rubéola, togavirus, ortomixovirus, retrovirus, hepadnavirus, coxsackievirus, virus de la encefalitis equina, el virus de la encefalitis japonesa, el virus de la fiebre amarilla, virus de la fiebre del Valle del Rift, el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, o virus de la hepatitis E.

Los antígenos de linfocitos B incluyen moléculas pequeñas, tal como una sustancia que crea dependencia, una sustancia adictiva, o una toxina.

Los antígenos de linfocitos B incluyen sustancias que crean dependencia, tales como nicotina, un narcótico, un alucinógeno, un estimulante, un supresor de la tos, un tranquilizante, o un sedante, y un opioide o benzodiacepina.

Los antígenos de linfocitos B incluyen toxinas, tal como una arma química (por ejemplo, toxina botulínica o fosfeno).
 5 Las toxinas de una arma química incluyen también, pero sin limitación, O-Alquilo (<C10, incl. cicloalquil) alquilo (Me, Et, n-Pr o i-Pr)-fosfonofluoridatos (por ejemplo, Sarín: O-Isopropil metilfosfonofluoridato, Soman: O-Pinacolil metilfosfonofluoridato), O-Alquilo (<C10, incl. cicloalquilo) N,N-dialquilo (Me, Et, n-Pr o i-Pr) fosforamidocianidatos (por ejemplo, Tabun: O-Etil N,N-dimetilfosforamidocianidato), O-Alquilo (H o <C10, incl. cicloalquilo) S-2- dialquilo (Me, Et, n-Pr o i-Pr)-aminoetil alquilo (Me, Et, n- Pr o i-Pr) fosfonotiolatos y las sales alquiladas o protonadas correspondientes (por ejemplo, VX: O-Etil S-2-diisopropilaminoetil metilfosfonotiolato), Mostazas de azufre: Sulfuro de 2-cloroetilclorometilo, Gas mostaza: sulfuro de Bis(2-cloroetilo), Bis(2-cloroetil)metano, Sesquimostazas: 1,2-Bis(2-cloroetil)etano, 1,3-Bis(2-cloroetil)propano, 1,4- Bis(2-cloroetil)butano, 1,5- Bis(2-cloroetil)pentano, Bis(2-cloroetil)éter, Mostaza O: Bis(2-cloroetil)éter, Lewisites: Lewisite 1: 2-Clorovinildicloroarsina, Lewisite 2: Bis(2-clorovinil)cloroarsina, Lewisite 3: Tris(2-clorovinil)arsina, Mostazas de nitrógeno: HN1: Bis(2-cloroetil)etilamina, HN2: Bis(2-cloroetil)metilamina, HN3: Tris(2-cloroetil)amina, Saxitoxina, Ricina, Amitón: O,O-Dietil S-(2-(dietilamino)etil)fosforotiolato y las sales alquiladas o protonadas correspondientes, PFIB: 1,1,3,3,3-Pentafluoro-2-(trifluorometil)-1-propeno, 3- Quinuclidinil bencilato (BZ), Fosgeno: Dicloruro de carbonilo, Cloruro de cianógeno, Cianuro de hidrógeno y Cloropicrina: Tricloronitrometano. En algunas realizaciones, la toxina para la inclusión en un nanotransportador es la molécula completa de cualquiera de las anteriores o una parte de la misma.

El antígeno de linfocitos B incluye riesgos biológicos o agentes peligrosos para el medio ambiente, tales como arsénico, plomo, mercurio, cloruro de vinilo, bifenilos policlorados, benceno, hidrocarburos aromáticos policíclicos, cadmio, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, cloroformo, diclordifenil-tricloretileno (DDT), P,P', aroclor 1254, aroclor 1260, dibenzo(a,h)antraceno, tricloroetileno, dieldrina, cromo hexavalente, o p,p'-diclorodifenil-dicloroeteno (DDE, P,P').

Los antígenos de linfocitos B incluyen hidratos de carbono, tales como uno procedente de un agente infeccioso (por ejemplo, una bacteria, hongo, virus, protozoo, o parásito, tales como una bacteria que siendo la bacteria *Pseudomonas*, *Pneumococcus*, *E. coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Borrelia*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Clostridium*, salmonela, *Legionella*, *Vibrio* o *Enterococci* o un *Mycobacterium*, y siendo el virus un virus de la viruela, el virus de la viruela, virus del Ébola, virus de Marburg, el virus del dengue, virus de la gripe, virus paragripal, virus respiratorio sincitial, virus de la rubéola, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del papiloma humano, el virus de la varicela-zóster, virus del herpes simple, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, JC virus, rabdovirus, rotavirus, rinovirus, el adenovirus, virus del papiloma, parvovirus, picornavirus, el poliovirus, virus que producen paperas, virus que producen rabia, reovirus, el virus de la rubéola, togavirus, ortomixovirus, retrovirus, hepadnavirus, coxsackievirus, virus de la encefalitis equina, el virus de la encefalitis japonesa, el virus de la fiebre amarilla, virus de la fiebre del Valle del Rift, el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, o virus de la hepatitis E).

Los antígenos de linfocitos B incluyen autoantígenos, tal como un péptido o proteína, lipoproteína, lípido, hidrato de carbono, o un ácido nucleico. En algunas realizaciones, el autoantígeno es una enzima, una proteína estructural, una proteína secretada, un receptor superficial celular, o una citoquina. En algunas realizaciones, la citoquina es TNF, IL-1, o IL-6. En algunas realizaciones, el autoantígeno es la proteína de transferencia del éster de colesterol (CETP), la proteína A β asociada con Alzheimer, una enzima proteolítica que procesa la forma patológica de la proteína A β , LDL asociado con aterosclerosis, o un correceptor para VIH-1. En algunas realizaciones, la enzima proteolítica que procesa la forma patológica de la proteína A β es la beta secretasa. En algunas realizaciones, el LDL asociado con aterosclerosis está oxidado o mínimamente modificado. En algunas realizaciones, el correceptor de VIH-1 es CCR5. En algunas realizaciones, el autoantígeno es un antígeno de enfermedad autoinmunitaria.

En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos B es un antígeno de enfermedad degenerativa, un antígeno de enfermedad infecciosa, un antígeno de cáncer, un antígeno de enfermedad atópica, un antígeno de enfermedad autoinmune, o una enzima de enfermedad metabólica o uno de sus productos enzimáticos.

En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno del cáncer. En algunas realizaciones, el antígeno de cáncer es Melan-A/MART-1, Dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), proteína de unión a la adenosina desaminasa (ADA β), ciclofilina b, Antígeno asociado colorrectal (CRC)-C017-1A/GA733, Antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus epítopos inmunógenos CAP-1 y CAP-2, etv6, aml1, antígeno específico de próstata (PSA) y sus epítopos inmunógenos PSA-1, PSA-2, y PSA-3, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), receptor de linfocitos T/cadena CD3-zeta, familia MAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), familia GAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -fetoproteína, E-caderina, α -catenina, β -catenina and γ -catenina, p120ctn, gp100^{Pmel117}, PRAME, NY-ESO-1, glicogenofosforilasa cerebral, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL- 40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1, CT-7, cdc27,

proteína coli de poliposis adenomatosa (APC), fodrin, P1A, Connexin 37, Idiotipo Ig, p15, gp75, gangliósidos GM2 y GD2, productos víricos tales como proteínas del virus del papiloma humano, familia Smad de antígenos tumorales, Imp-1, antígeno nuclear codificado por el VEB (EBNA)-1, o c-erbB-2.

5 En algunas realizaciones, el antígeno de enfermedad infecciosa es un antígeno vírico. En algunas realizaciones, el antígeno vírico es un antígeno de un virus de la viruela, el virus de la viruela, virus del Ébola, virus de Marburg, el virus del dengue, virus de la gripe, virus paragripal, virus respiratorio sincitial, virus de la rubéola, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del papiloma humano, el virus de la varicela-zóster, virus del herpes simple, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, JC virus, rabdovirus, rotavirus, rinovirus, el adenovirus, virus del papiloma, parvovirus, picornavirus, el poliovirus, virus que producen paperas, virus que producen rabia, reovirus, el virus de la rubéola, togavirus, ortomixovirus, retrovirus, hepadnavirus, coxsackievirus, virus de la encefalitis equina, el virus de la encefalitis japonesa, el virus de la fiebre amarilla, virus de la fiebre del Valle del Rift, el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, o virus de la hepatitis E.

15 En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos B es un antígeno poco inmunógeno. Los antígenos poco inmunógenos incluyen un antígeno no proteico, hidratos de carbono, moléculas pequeñas, sustancias adictivas, sustancias que crean dependencia, toxinas (tales como un arma química), agentes peligrosos para el medio ambiente, o autoantígeno.

20 En general, el antígeno de linfocitos T es una proteína o péptido. En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos T es un antígeno de enfermedad degenerativa, un antígeno de enfermedad infecciosa, un antígeno de cáncer, un antígeno de enfermedad atópica, un antígeno de enfermedad autoinmunitaria, un aloantígeno, un xenoantígeno, un alérgeno, un sensibilizador de contacto, un hapteno, o una enzima de enfermedad metabólica o un producto enzimático.

25 En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos T es de un agente infeccioso. En algunas realizaciones, el agente infeccioso es una bacteria, hongo, virus, protozoo, o parásito. En algunas realizaciones, el antígeno de enfermedad infecciosa es un antígeno vírico. En algunas realizaciones, el antígeno vírico es un antígeno de un virus de la viruela, el virus de la viruela, virus del Ébola, virus de Marburg, el virus del dengue, virus de la gripe, virus paragripal, virus respiratorio sincitial, virus de la rubéola, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del papiloma humano, el virus de la varicela-zóster, virus del herpes simple, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, JC virus, rabdovirus, rotavirus, rinovirus, el adenovirus, virus del papiloma, parvovirus, picornavirus, el poliovirus, virus que producen paperas, virus que producen rabia, reovirus, el virus de la rubéola, togavirus, ortomixovirus, retrovirus, hepadnavirus, coxsackievirus, virus de la encefalitis equina, el virus de la encefalitis japonesa, el virus de la fiebre amarilla, virus de la fiebre del Valle del Rift, el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, o virus de la hepatitis E.

35 En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos T es un antígeno de linfocitos T universal. En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos T universal es uno o más péptidos derivados del toxoide del tétanos, el virus de Epstein-Barr, o el virus de la gripe.

45 Los agentes inmunoestimuladores incluyen interleuquinas, interferones, citocinas, etc. Los agentes inmunoestimuladores son agonistas del receptor de tipo toll (TLR). Los agentes inmunoestimuladores incluyen también un agonista del receptor de citoquinas, un agonista de CD40, un agonista del receptor Fc, un ácido nucleico inmunoestimulador que contiene Cpg, un agonista del receptor del complemento, o un adyuvante. En algunas realizaciones, el agonista de TLR es un agonista de TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-7, TLR-8, TLR-9 o TLR-10. Los agonistas del receptor Fc incluyen agonistas del receptor Fc-gamma. Un agonista del receptor del complemento puede unirse a CD21 o CD35. Un agonista del receptor del complemento puede inducir la opsonización del complemento endógeno del nanotransportador. Los agonistas del receptor de las citoquinas incluyen una citoquina (tal como una molécula pequeña, anticuerpo, proteína de fusión, o aptámero). Los agentes inmunoestimuladores incluyen un adyuvante. El adyuvante puede inducir la biosíntesis de citoquinas. Los adyuvantes incluyen alum, MF59, R848, la toxina del cólera, escualeno, adyuvantes de fosfato, o tetraclorodecaóxido. Los adyuvantes incluyen monofosforil lípido A (MPL, SmithKline Beecham); saponinas incluyendo QS21 (SmithKline Beecham); oligonucleótidos inmunoestimuladores (por ejemplo, oligonucleótidos

50 inmunoestimuladores CpG descritos en primer lugar por Krieg et al., Nature 374:546-9, 1995); adyuvante incompleto de Freund; adyuvante completo de Freund; montanida; vitamina E y diversas emulsiones de agua en aceite preparadas a partir de aceites biodegradables tales como escualeno y/o tocoferol, Quil A, Ribi Detox, CRL-1005, o L-121.

60 En realizaciones específicas, un agente inmunoestimulador puede ser un agonista natural o sintético para un receptor de tipo Toll (TLR). En realizaciones específicas, un agente inmunoestimulador puede ser un ligando para un receptor de tipo toll (TLR)-7, tal como CpGs, que induce la producción de interferón de tipo I, un agonista para la molécula superficial de DC CD40; un agente que promueve la maduración de DC; un agonista de TLR-4; una citoquina; estímulos proinflamatorios liberados de las células necróticas (*por ejemplo*, cristales de urato);

65 componentes activados de la cascada del complemento (por ejemplo, CD21, CD35, *etc.*); y así sucesivamente.

En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento se une a un receptor expresado sobre la superficie de una célula. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento se une a un receptor soluble. En algunas realizaciones, el receptor soluble es una proteína del complemento o un anticuerpo preexistente. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento es para la administración del nanotransportador a las células presentadoras de antígeno, linfocitos T o linfocitos B. En algunas realizaciones, las células presentadoras de antígeno son macrófagos. En algunas realizaciones, los macrófagos son macrófagos del seno subcapsular. En algunas realizaciones, las células presentadoras de antígeno son células dendríticas. En algunas realizaciones, las células presentadoras de antígeno son células dendríticas foliculares.

En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento es una molécula que se une a CD1 1b, CD169, receptor de manosa, DEC-205, CD11c, CD21/CD35, CX3CR1, o un receptor de Fc. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento es una molécula que se une a CD169, CX3CR1, o un receptor de Fc. En algunas realizaciones, la molécula que se une a CD169 es un anticuerpo dirigido contra CD169. En algunas realizaciones, la molécula que se une a CX3CR1 es CX3CL1 (fractalkina). En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento comprende la porción Fc de una inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento comprende la porción Fc de una IgG. En algunas realizaciones, la porción Fc de una inmunoglobulina es una porción Fc humana de una inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la porción Fc de una IgG es una porción Fc humana de una IgG. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento es el receptor soluble, CRFc. En algunas realizaciones, CRFc se puede usar para dirigirse a macrófagos en el seno subcapsular pero no a los macrófagos de la médula. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento es uno o más restos amina.

En algunos aspectos, las composiciones proporcionadas en el presente documento son inmunógenas.

Algunos aspectos comprenden administrar cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento a un sujeto en una cantidad eficaz para modular una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, la composición está en una cantidad eficaz para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, la composición está en una cantidad eficaz para suprimir una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, la composición está en una cantidad eficaz para dirigir o redirigir una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, los nanotransportadores son para la profilaxis y/o el tratamiento de las dolencias identificadas en el presente documento.

En algunas realizaciones, cuando los nanotransportadores son para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria, el sujeto tiene, o es susceptible de tener cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad metabólica o degenerativa no autoinmunitaria, una enfermedad atópica, una enfermedad alérgica, o una adicción. En algunas realizaciones, el sujeto se ha expuesto o puede estar expuesto a una toxina. En algunas realizaciones, el sujeto se ha expuesto o puede estar expuesto a una toxina procedente de un arma química. En algunas realizaciones, el sujeto se ha expuesto o puede estar expuesto a una toxina procedente de una sustancia peligrosa para el medio ambiente. En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende un antígeno de linfocitos B, un agente inmunoestimulador, y un antígeno de linfocitos T, tal como un antígeno de linfocitos T universal. En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende además un resto de direccionamiento.

En algunas realizaciones, donde los nanotransportadores son para el tratamiento o la prevención de una adicción (o para tratar a un sujeto expuesto o que se puede exponer a una toxina), el nanotransportador comprende la sustancia adictiva o la toxina, un adyuvante, y un linfocito T. En algunas realizaciones, los nanotransportadores activan un elevado número de anticuerpo que se unen y neutralizan el agente atacante antes de que alcance su sitio efector (por ejemplo, el cerebro). En algunas realizaciones, la sustancia adictiva o toxina está en una alta densidad sobre la superficie del nanotransportador.

En algunas realizaciones, la enfermedad infecciosa es una infección viral crónica. En algunas realizaciones, la infección vírica crónica es una infección por VIH, VPH, VHB o VHC. En algunas realizaciones, la enfermedad infecciosa es o está producida por una infección bacteriana. En algunas realizaciones, el sujeto tiene o es susceptible de tener una infección de *Pseudomonas*, una infección de *Pneumococcus*, tuberculosis, malaria, leishmaniasis, *H. pylori*, una infección por *Staphylococcus* o una infección por *Salmonella*. En algunas realizaciones, la enfermedad infecciosa es o está producida por una infección fúngica. En algunas realizaciones, la enfermedad infecciosa es o está producida por una infección parasitaria. En algunas realizaciones, la enfermedad infecciosa es o está producida por una infección protozoaria. En algunas realizaciones, el sujeto tiene o es susceptible de tener gripe.

En algunas realizaciones, la composición se administra en una cantidad eficaz para modificar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria de Th2 a Th1). En algunas realizaciones, el sujeto tiene o es susceptible de tener una enfermedad alérgica.

En algunos aspectos, se proporcionan nanotransportadores de vacunas para la administración de agentes inmunomoduladores a las células del sistema inmunitario. En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas comprenden al menos un agente inmunomodulador que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria en linfocitos B y/o en linfocitos T. En determinadas realizaciones, los agentes inmunomoduladores presentados sobre

las superficies de nanotransportadores estimulan a los linfocitos B, y los agentes inmunomoduladores encapsulados en los nanotransportadores se procesan y presentan a los linfocitos T. En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas comprenden al menos un resto de direccionamiento que es útil para la administración selectiva del nanotransportador de vacunas a células presentadoras de antígeno (APC) específicas.

5 En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador puede comprender proteínas o péptidos aislados y/o recombinantes, hidratos de carbono, glucoproteínas, glucopéptidos, proteoglicanos, organismos y virus inactivados, organismos y virus muertos, organismos o virus genéticamente alterados, y extractos celulares. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador puede comprender ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, y/o moléculas pequeñas. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador es aquel que estimula una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador es un antígeno. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador se usa para vacunas.

15 En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador es cualquier proteína y/u otro antígeno derivado de un patógeno. El patógeno puede ser un virus, bacteria, hongo, por protozoos, parásito, etc. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador puede estar en la forma de organismos muertos completos, péptidos, proteínas, glucoproteínas, glucopéptidos, proteoglicanos, hidratos de carbono, o sus combinaciones.

20 En algunas realizaciones, todos los agentes inmunomoduladores de un nanotransportador de vacuna son idénticos entre sí. En algunas realizaciones, todos los agentes inmunomoduladores de un nanotransportador de vacunas son diferentes. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende exactamente un tipo distinto (es decir, una especie) de agente inmunomodulador. Por ejemplo, cuando el agente inmunomodulador es un antígeno, todos los antígenos que están en el nanotransportador de vacunas son iguales. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende exactamente dos tipos distintos de agentes inmunomoduladores. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende más de dos tipos distintos de agentes inmunomoduladores.

30 En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende un único tipo de agente inmunomodulador que estimula una respuesta inmunitaria en linfocitos B. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende un único tipo de agente inmunomodulador que estimula una respuesta inmunitaria en linfocitos T. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende dos tipos de agentes inmunomoduladores, en el que el primer agente inmunomodulador estimula los linfocitos B, y el segundo agente inmunomodulador estimula los linfocitos T. En determinadas realizaciones, cualquiera de los agentes anteriormente mencionado podría estimular los linfocitos B y los linfocitos T, pero no es necesariamente de esta manera. En determinadas realizaciones, los agentes inmunomoduladores anteriormente mencionados estimulan solo linfocitos B o linfocitos T, respectivamente. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende más de dos tipos distintos de agentes inmunomoduladores, en el que uno o más tipos de agentes inmunomoduladores estimulan los linfocitos B, y uno o más tipos de agentes inmunomoduladores estimulan los linfocitos T.

40 En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas incluye una membrana lipídica (por ejemplo, una bicapa lipídica, una monocapa lipídica, etc.). Al menos un agente inmunomodulador puede estar asociado con la membrana lipídica. En algunas realizaciones, al menos un agente inmunomodulador está incluido en la membrana lipídica, incluido en la luz de la bicapa lipídica, asociado con la superficie interior de la membrana lipídica, y/o encapsulado con la membrana lipídica de un nanotransportador de vacunas.

45 El nanotransportador de vacunas incluye un polímero (por ejemplo, un núcleo polimérico). El agente inmunomodulador puede estar asociado con el polímero, y en algunas realizaciones, al menos un tipo de agente inmunomodulador está asociado con el polímero. En algunas realizaciones, el agente inmunomodulador está incluido en el polímero, asociado con la superficie interior del polímero, y/o encapsulado en el polímero de un nanotransportador de vacunas, y, en algunas realizaciones, al menos un tipo de agente inmunomodulador está incluido en el polímero, asociado con la superficie interior del polímero, y/o encapsulado en el polímero de un nanotransportador de vacunas.

55 En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas inventivos comprenden menos de 90 % en peso, menos de 75 % en peso, menos de 50 % en peso, menos de 40 % en peso, menos de 30 % en peso, menos de 20 % en peso, menos de 15 % en peso, menos de 10 % en peso, menos de 5 % en peso, menos de 1 % en peso o menos de 0,5 % en peso del agente inmunomodulador.

60 En algunas realizaciones, los transportadores de vacunas están asociados con al menos un resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento puede ser un ácido nucleico, polipéptido, un péptido, glucoproteína, glucopéptido, proteoglicano, hidrato de carbono, lípido, molécula pequeña, etc. Por ejemplo, un resto de direccionamiento puede ser un resto de direccionamiento de ácido nucleico (por ejemplo, un aptámero, Spiegelmer® etc.) que se une a un marcador específico del tipo de célula. En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento puede ser un ligando que se produce naturalmente o un ligando sintético de una proteína de la superficie celular, *por ejemplo*, DEC-205, CD169, CD11b, etc. Los ejemplos de restos de direccionamiento incluyen también aquellos proporcionados en otra parte en el presente documento, tal como los descritos

anteriormente.

De acuerdo con la presente invención, un resto de direccionamiento reconoce una o más "dianas" o "marcadores" asociados con un órgano, tejido, célula, y/o local subcelular. En algunas realizaciones, una diana puede ser un
 5 marcador que se asocia de manera exclusiva o principal a uno o a unos pocos tipos de células, con una o unas pocas enfermedades y con una o unas pocas etapas de desarrollo. Los ejemplos de células que se dirigen incluyen células presentadoras de antígeno (APC, *antigen presenting cells*), tales como células dendríticas, células dendríticas foliculares, y macrófagos. Un ejemplo de un macrófago es un macrófago del seno subcapsular. Otras
 10 células que se dirigen incluyen linfocitos T y linfocitos B. En algunas realizaciones, una diana puede comprender una proteína, un hidrato de carbono, un lípido, y/o un ácido nucleico. En algunas realizaciones, una diana es un marcador tumoral. En algunas realizaciones, una diana es un marcador de APC. En determinadas realizaciones, una diana es un marcador de linfocitos T. En algunas realizaciones, los restos de direccionamiento se dirigen a tejidos u
 15 órganos linfoides secundarios. Los tejidos u órganos linfoides secundarios incluyen los ganglios linfáticos, el bazo, las placas de Peyser, el apéndice, o las amígdalas.

En determinadas realizaciones, una diana es un marcador de célula dendrítica. En algunas realizaciones, los marcadores de DC incluyen DC-205, CD11c, MHC de clase II, CD80, CD86, DC-SIGN, CD11b, BDCA-1, BDCA-2, BDCA-4, Siglec-H, CX3CR1, y/o Langerina. Se proporcionan en otra parte en el presente documento ejemplos de
 20 dichos marcadores.

En determinadas realizaciones, una diana es un marcador de macrófago de seno subcapsular. En algunas realizaciones, los marcadores de SCS-Mph incluyen CD169 (*es decir*, sialoadhesina), CD11b (*es decir*, CD11b/CD18, Mac-1, CR3 o $\alpha M\beta 2$ integrina), el receptor de Fc, y/o el receptor de manosa (*es decir*, una lectina multivalente), proteínas que se expresan todas de forma prominente en SCS-Mph. Se proporcionan en otra parte en
 25 el presente documento ejemplos de dichos marcadores.

En determinadas realizaciones, una diana es un marcador de linfocitos B. En algunas realizaciones, los marcadores de linfocitos B pueden incluir receptores del complemento, CR1 (*es decir*, CD35) or CR2 (*es decir*, CD21), proteínas que se expresan en linfocitos B. En algunas realizaciones, el direccionamiento de linfocitos B puede llevarse a cabo
 30 mediante marcadores de linfocitos B tales como CD19, CD20, y/o CD22. En algunas realizaciones, el direccionamiento de linfocitos B puede llevarse a cabo mediante marcadores de linfocitos B tales como CD40, CD52, CD80, CXCR5, VLA-4, MHC de clase II, IgM o IgD superficial, APRL, y/o BAFF-R. Se proporcionan en otra parte en el presente documento ejemplos de dichos marcadores.

En determinadas realizaciones, una diana es un marcador de FDC. En algunas realizaciones, los marcadores de FDC incluyen receptores del complemento, CR1 (*es decir*, CD35) or CR2 (*es decir*, CD21), proteínas que se expresan en FDC. Se proporcionan en otra parte en el presente documento ejemplos de dichos marcadores.
 35

En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende un único tipo de resto de direccionamiento que dirige la administración del nanotransportador de vacunas a un único tipo de célula (por ejemplo, administración solo a SCS-Mph). En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende un único tipo de resto de
 40 direccionamiento que dirige la administración del nanotransportador de vacunas a múltiples tipos de células (por ejemplo, administración a SCS-Mph y FDC, o para SCS-Mph y DC). En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende dos tipos de restos de direccionamiento, en el que el primer tipo de resto de direccionamiento dirige la administración del nanotransportador de vacunas a un tipo de célula, y el segundo tipo de
 45 resto de direccionamiento dirige la administración del nanotransportador de vacunas a un segundo tipo de célula. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el primer tipo de resto de direccionamiento dirige la administración a las SCS-Mph, y el segundo tipo de resto de direccionamiento dirige la administración a las DC. Como otro ejemplo, el primer tipo de resto de direccionamiento dirige la administración a las SCS-Mph, y el segundo tipo de resto de
 50 direccionamiento dirige la administración a las FDC.

En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas inventivos comprenden menos de 50 % en peso, menos de 40 % en peso, menos de 30 % en peso, menos de 20 % en peso, menos de 15 % en peso, menos de 10 % en peso, menos de 5 % en peso, menos de 1 % en peso o menos de 0,5 % en peso del resto de
 55 direccionamiento.

En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas pueden transportar uno o más tipos de agentes inmunoestimuladores que pueden ayudar a estimular respuestas inmunitarias. En algunas realizaciones, los agentes inmunoestimuladores refuerzan las respuestas inmunitarias activando las APC para potenciar su capacidad
 60 inmunoestimuladora. En algunas realizaciones, los agentes inmunoestimuladores refuerzan respuestas inmunitarias amplificando las respuestas de los linfocitos a antígenos específicos. En algunas realizaciones, los agentes inmunoestimuladores refuerzan respuestas inmunitarias induciendo la liberación local de mediadores, dichas citoquinas proceden de varios tipos de células.

En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende un único tipo de agente inmunoestimulador que estimula linfocitos B y linfocitos T. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende dos
 65

tipos de agentes inmunoestimuladores, en el que el primer tipo de agente inmunoestimulador estimula linfocitos B, y el segundo tipo de agente inmunoestimulador estimula linfocitos T. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende más de dos tipos distintos de agentes inmunoestimuladores, en el que uno o más tipos de agentes inmunoestimuladores estimulan linfocitos B, y uno o más tipos de agentes inmunoestimuladores estimulan linfocitos T.

En algunas realizaciones, se pueden utilizar diversos ensayos a fin de determinar si una respuesta inmunitaria se ha modulado en un linfocito B o en un grupo de linfocitos B o en un linfocito T o en un grupo de linfocitos T. En algunas realizaciones, el ensayo evalúa si se ha/han llegado a "activar" o no la célula o grupo de células.

En algunas realizaciones, se pueden utilizar diversos ensayos a fin de determinar si se ha estimulado una respuesta inmunitaria en un linfocito T o en un grupo de linfocitos T. En algunas realizaciones, la estimulación de una respuesta inmunitaria en linfocitos T puede determinarse midiendo la producción de citoquinas inducidas por antígenos por los linfocitos T. En algunas realizaciones, la estimulación de una respuesta inmunitaria en linfocitos T puede determinarse midiendo la proliferación de linfocitos T inducida por antígenos. En algunas realizaciones, se determina una respuesta inmunitaria en linfocitos T para ser estimulada si se expresan marcadores celulares de activación de linfocitos T a diferentes niveles (*por ejemplo*, niveles superiores o inferiores) con respecto a células sin estimular.

En algunas realizaciones, se pueden utilizar diversos ensayos a fin de determinar si se ha estimulado una respuesta inmunitaria en un linfocito B o en un grupo de linfocitos B. En algunas realizaciones, la estimulación de una respuesta inmunitaria en linfocitos B puede determinarse midiendo los títulos de anticuerpos, las afinidades de los anticuerpos, el comportamiento de los anticuerpos en ensayos de neutralización, recombinación por intercambio de clase, maduración por afinidad o anticuerpos específicos de antígenos, desarrollo de linfocitos B con memoria, desarrollo de células plasmáticas de vida prolongada que pueden producir grandes cantidades de anticuerpos de elevada afinidad durante periodos alargados de tiempo, reacciones de centros germinales, y/o comportamiento de anticuerpos en ensayos de neutralización.

Un nanotransportador de vacunas es una entidad que comprende, por ejemplo, al menos un agente inmunomodulador que es capaz de estimular una respuesta inmunitaria en linfocitos B y/o en linfocitos T.

Se pueden usar varios nanotransportadores diferentes de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, los nanotransportadores son esferas o esferoides. En algunas realizaciones, los nanotransportadores tienen forma plana o de placa. En algunas realizaciones, los nanotransportadores son cubos o cuboides. En algunas realizaciones, los nanotransportadores son óvalos o elipses. En algunas realizaciones, los nanotransportadores son cilindros, conos, o pirámides. Los nanotransportadores pueden ser huecos y pueden comprender una o más capas. En algunas realizaciones, cada capa tiene una única composición y unas únicas propiedades con respecto a las otras capa(s). Para dar, pero a modo de ejemplo, nanotransportadores que tienen una estructura de núcleo/envoltura, en el que el núcleo es una capa (por ejemplo, un núcleo polimérico) y la envoltura es una segunda capa (por ejemplo, una bicapa o monocapa lipídica). Los nanotransportadores pueden comprender una pluralidad de diferentes capas. En algunas realizaciones, una capa puede estar sustancialmente reticulada, una segunda capa no está sustancialmente reticulada, y así sucesivamente. En algunas realizaciones, una, unas pocas, o todas las diferentes capas pueden comprender uno o más agentes inmunomoduladores, restos de direccionamiento, agentes inmunoestimuladores, y/o sus combinaciones. En algunas realizaciones, una capa comprende un agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, y/o un agente inmunoestimulador, una segunda capa no comprende un agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, y/o un agente inmunoestimulador, y así sucesivamente. En algunas realizaciones, cada capa individual comprende un agente inmunomodulador diferente, un resto de direccionamiento, una agente inmunoestimulador, y/o sus combinaciones.

En algunas realizaciones, los nanotransportadores pueden comprender opcionalmente uno o más lípidos. En algunas realizaciones, un nanotransportador comprende una bicapa lipídica. En algunas realizaciones, un nanotransportador comprende una monocapa lipídica. En algunas realizaciones, un nanotransportador comprende un núcleo de una matriz polimérica rodeado por una capa lipídica (por ejemplo, una bicapa lipídica, una monocapa lipídica, etc.).

El nanotransportador comprende uno o más polímeros. En algunas realizaciones, una matriz polimérica puede estar rodeada por una capa de revestimiento (por ejemplo, un liposoma, una monocapa lipídica, micela, etc.). En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, y/o un agente inmunoestimulador pueden asociarse con la matriz polimérica. En dichas realizaciones, el agente inmunomodulador, el resto de direccionamiento, y/o el agente inmunoestimulador están encapsulados eficazmente en el nanotransportador.

En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador, el resto de direccionamiento, y/o el agente inmunoestimulador pueden estar asociados covalentemente con un nanotransportador. En algunas realizaciones, la asociación covalente está mediada por un enlazador. En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento de un agente inmunomodulador, y/o el agente inmunoestimulador se asocia no covalentemente con un nanotransportador. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un agente inmunomodulador, el resto de direccionamiento, y/o un agente inmunoestimulador están encapsulados, rodeados por, y o dispersos en una matriz

polimérica, una membrana lipídica, etc. De forma alternativa o adicional, un agente inmunomodulador, resto de direccionamiento, y/o el agente inmunoestimulador pueden estar asociados con una matriz polimérica, una membrana lipídica, etc. mediante interacciones hidrófobas, interacciones de carga, fuerzas de van der Waals, etc.

- 5 Se conocen en la técnica de administración de fármacos una amplia variedad de polímeros y métodos para formar matrices poliméricas a partir de los anteriores. En general, una matriz polimérica comprende uno o más polímeros. Los polímeros pueden ser polímeros naturales o polímeros no naturales (sintéticos). Los polímeros pueden ser homopolímeros o copolímeros que comprenden dos o más monómeros. En términos de secuencia, los copolímeros pueden ser aleatorios, en bloque o comprender una combinación de secuencias aleatorias y en bloque. En algunas realizaciones, los polímeros son polímeros dendríticos o mezclas de polímeros.

15 Los ejemplos de polímeros incluyen polietilenos, policarbonatos (por ejemplo, poli(1,3-dioxan-2ona)), polianhídridos (por ejemplo, poli(anhídrido sebácico)), polihidroxiácidos (por ejemplo, poli(β -hidroxialcanoato)), polipropilfumaratos, policaprolactonas, poliamidas (por ejemplo, policaprolactama), poliacetales, poliéteres, poliésteres (por ejemplo, poliláctido, poliglicólido), poli(ortoésteres), policianoacrilatos, poli(alcoholes vinílicos), poliuretanos, polifosfacenos, poliacrilatos, polimetacrilatos, poliureas, poliestirenos, y poliaminas.

20 En algunas realizaciones, los nanotransportadores pueden comprender opcionalmente una o más entidades anfífilas (es decir, entidades que poseen propiedades hidrófilas e hidrófobas). En algunas realizaciones, una entidad anfífila puede promover la producción de nanotransportadores con estabilidad aumentada, uniformidad mejorada, o viscosidad aumentada.

25 En algunas realizaciones, un nanotransportador comprende una o más nanopartículas asociadas con la superficie exterior y/o encapsuladas en el nanotransportador.

30 Los nanotransportadores pueden prepararse usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las formulaciones de nanotransportadores particulados puede estar formadas por métodos tales como la nanoprecipitación, centrado de flujo usando canales de fluido, secado por pulverización, evaporación en disolvente mediante emulsión única y doble, extracción con disolvente, separación de fases, molienda, procedimiento de microemulsión, microfabricación, nanofabricación, capas de sacrificio, coacervación simple y compleja, así como otros métodos bien conocidos por las personas normalmente expertas en la técnica. De forma alternativa o adicional, se puede utilizar la síntesis de disolventes acuosos y orgánicos para semiconductores monodispersos, conductores, magnéticos, orgánicos, y otras nanopartículas.

35 En algunas realizaciones, los agentes inmunomoduladores y/o los restos de direccionamiento no están asociados covalentemente con un nanotransportador. Por ejemplo, los nanotransportadores pueden comprender una matriz polimérica y agentes inmunomoduladores y/o restos de direccionamiento que están asociados con la superficie, encapsulados en, y/o distribuidos a través de la matriz polimérica de un nanotransportador inventivo. Los agentes inmunomoduladores pueden ser liberados mediante difusión, degradación del nanotransportador, y/o una de sus combinaciones. En algunas realizaciones, El(los) polímero(s) del nanotransportador se degradan mediante erosión en volumen. En algunas realizaciones, el(los) polímero(s) del nanotransportador se degrada(n) mediante erosión superficial.

45 En algunas realizaciones, los agentes inmunomoduladores, los restos de direccionamiento, y/o los agentes inmunoestimuladores se asocian covalentemente con una partícula. En algunas realizaciones, la asociación covalente está mediada por uno o más enlazadores. Se puede usar cualquier enlazador adecuado de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador escindible (por ejemplo, un enlace éster, un enlace amida, un enlace disulfuro, etc.).

50 En algunas realizaciones, los nanotransportadores se preparan mediante autoensamblaje. Como ejemplo comparativo, los lípidos se mezclan con un agente inmunomodulador lipófilo, y a continuación se forman en películas finas sobre una superficie sólida. Un agente inmunomodulador se disuelve en una solución acuosa, que se añade a las películas lipídicas para hidrolizar los lípidos con vortización. Los liposomas con los agentes inmunomoduladores lipófilos incorporados en la pared de la bicapa, y los agentes inmunomoduladores situados en la luz del liposoma se ensamblan de forma espontánea. En determinadas realizaciones, las nanopartículas preformuladas se mezclan con liposomas pequeños con vortización suave para inducir la fusión de liposomas sobre la superficie de nanopartículas poliméricas.

60 Como otro ejemplo comparativo, un agente inmunomodulador hidrófilo que se va a encapsular se incorpora en primer lugar en micelas inversas mezclando con entidades anfífilas naturalmente derivadas y entidades anfífilas no tóxicas en un compuesto volátil, un disolvente orgánico miscible en agua. En algunas realizaciones, se añade un polímero biodegradable una vez que se ha completado la formación de micelas inversas. La mezcla de micelas inversas-polímeros biodegradables resultante se combina con un no disolvente hidrófilo insoluble en polímero para formar nanopartículas mediante la difusión rápida del disolvente en el no disolvente y la evaporación del disolvente orgánico.

65

En algunas realizaciones, se usan nanotransportadores poliméricos estabilizados en una monocapa lipídica para administrar uno o una pluralidad de agentes inmunomoduladores. En determinadas realizaciones, una molécula inmunomoduladora hidrófila se conjuga químicamente en primer lugar al grupo de cabeza polar de un lípido. El conjugado se mezcla con una proporción determinada de moléculas lipídicas no conjugadas en una solución acuosa que contiene uno o más disolventes miscibles con agua. Un material polimérico biodegradable se mezcla con los agentes inmunomoduladores hidrófobos para su encapsulación en un disolvente orgánico miscible con el agua o parcialmente miscible con el agua. La solución polimérica resultante se añade a la solución acuosa de lípido conjugado y no conjugado para producir nanopartículas mediante la difusión rápida del disolvente orgánico en el agua y la evaporación del disolvente orgánico.

Las composiciones descritas en el presente documento se pueden usar para la profilaxis y/o el tratamiento de cualquier enfermedad infecciosa, trastorno, y/o dolencia. Se proporcionan en otra parte del presente documento ejemplos de otras enfermedades, trastornos, y/o dolencias. En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas de acuerdo con la presente invención se pueden usar para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el inicio de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de, y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno, y/o dolencia. En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas inventivas se pueden usar para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el inicio de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de, y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de infección microbiana (por ejemplo, una infección bacteriana, infección fúngica, infección vírica, infección parasítica, etc.). En algunas realizaciones, la profilaxis y/o el tratamiento de la infección microbiana comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de nanotransportadores de vacunas inventivas a un sujeto que lo necesita, en cantidades tales y durante un tiempo tal como sea necesario para conseguir el resultado deseado. En determinadas realizaciones de la presente invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un nanotransportador de vacunas inventivo es que la cantidad eficaz para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el inicio de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de, y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas de características de la enfermedad, trastorno, y/o la dolencia proporcionada en el presente documento.

Los protocolos profilácticos y/o terapéuticos implican administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más transportadores de vacunas inventivos a un sujeto de tal manera que se modula una respuesta inmunitaria (por ejemplo, estimulada en linfocitos T y/o linfocitos B).

La presente invención proporciona composiciones que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más nanotransportadores de vacunas y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden nanotransportadores de vacunas inventivos. La composición puede incluir más de un tipo de nanotransportador, teniendo cada tipo diferentes constituyentes (por ejemplo, los agentes inmunomoduladores, agentes de direccionamiento, agentes inmunoestimuladores, excipientes, etc.). De acuerdo con algunas realizaciones, se proporciona administrar una composición farmacéutica que comprende composiciones inventivas a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que lo necesita.

En algunas realizaciones, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de un nanotransportador de vacunas inventivo a un paciente y/o animal antes, simultáneamente, y/o después de diagnóstico de una enfermedad, trastorno, y/o dolencia. En algunas realizaciones, se administra una cantidad terapéutica de una composición de nanotransportador de vacunas inventivo a un paciente y/o animal antes de, simultáneamente, y/o después de los síntomas de una enfermedad, trastorno, y/o dolencia. En determinadas realizaciones, se administra una cantidad terapéutica de una composición de nanotransportador de vacunas inventivo a un paciente y/o animal antes de la exposición a un agente infeccioso. En determinadas realizaciones, se administra una cantidad terapéutica de una composición de nanotransportador de vacunas inventivo a un paciente y/o animal tras la exposición a un agente infeccioso. En determinadas realizaciones, se administra una cantidad terapéutica de una composición de nanotransportador de vacunas inventivo a un paciente y/o animal antes de la exposición a una sustancia adictiva o una toxina. En determinadas realizaciones, se administra una cantidad terapéutica de una composición de nanotransportador de vacunas inventivo a un paciente y/o animal tras la exposición a una sustancia adictiva o una toxina.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran mediante varias rutas, que incluye administración oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, subcutánea, intraventricular, transdérmica, intradérmica, rectal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, pomadas, cremas, y/o gotas), transdérmica, mucosa, nasal, bucal, enteral, sublingual; mediante instilación traqueal, instilación bronquial, y/o inhalación; y/o como una pulverización, pulverización nasal, y/o aerosol. En determinadas realizaciones, la composición se administra por vía oral. En determinadas realizaciones, la composición se administra por vía parenteral. En determinadas realizaciones, la composición se administra mediante inyección intramuscular.

En determinadas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas que retrasan el inicio y/o la progresión de una enfermedad, trastorno, y/o dolencia (por ejemplo, una infección microbiana concreta) pueden administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales que tratan los síntomas de la enfermedad, trastorno,

y/o dolencia. Por ejemplo, los nanotransportadores de vacunas pueden combinarse con el uso de un agente anticanceroso, un agente antiinflamatorio, un antibiótico, o un agente antivírico.

5 La invención proporciona varios kits que comprenden uno o más de los nanotransportadores de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona un kit que comprende un nanotransportador inventivo e instrucciones para el uso. Un kit puede comprender múltiples nanotransportadores diferentes. Un kit puede comprender cualquiera de numerosos componentes o reactivos adicionales en cualquier combinación.

10 En algunas realizaciones, el kit comprende un nanotransportador inventivo e instrucciones para la mezcla.

En cualquiera de las realizaciones anteriores descritas anteriormente, la palabra conjugado significa conjugado de forma covalente o no covalente, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. En cualquiera de las realizaciones anteriores descritas anteriormente, la palabra encapsulado significa atrapado físicamente en, tanto en premezcla, mediante una envoltura que rodea un núcleo, mediante enlace covalente interno de la superficie del nanotransportador, y similar.

Breve descripción de los dibujos

20 *Figura 1:* Estrategia de direccionamiento de vacunas combinadas para una respuesta inmunitaria humoral y celular óptima. La vacuna compuesta transporta antígenos internos de linfocitos T, adyuvantes (no se muestran) y restos de direccionamiento para DC, FDC y SCS-Mph junto con el antígeno superficial para el reconocimiento de linfocitos B. Tras inyección s.c. o i.m., el material alcanza los ganglios linfáticos drenando los vasos linfáticos y se acumula en cada APC (por claridad, se muestran solo los restos de direccionamiento específicos de APC, pero cada APC adquiere el complejo entero. Las DC se internalizan y digieren el complejo y presentan péptidos antigénicos en MHC de clase I y clase II a linfocitos T CD8 y CD4, respectivamente. Los linfocitos T activados se diferencian en linfocitos efectores/memoria ($T_{Eff/Mem}$) que median respuestas inmunitarias celulares. Los linfocitos T_{FH} proporcionan ayuda a los linfocitos B, donde inicialmente se estimulan mediante el antígeno de SCS-Mph y en el proceso han adquirido y procesado antígenos de linfocitos T para la reestimulación de T_{FH} . La ayuda proporcionada por linfocitos T_{FH} permite el desarrollo de una reacción GC durante la cual los linfocitos B proliferan y generan anticuerpos de elevada afinidad.

25 *Figura 2:* Las SCS-Mph se unen a partículas transmitidas por los ganglios linfáticos y las presentan a los linfocitos B foliculares. (A) Tinción inmunohistoquímica de la corte de un ganglio linfático popliteal de ratón teñido con un anticuerpo dirigido contra CD169 y contrateñido con aglutinina de germen de trigo. El ganglio linfático se cosechó 30 minutos después de la inyección a la almohadilla plantar del virus de la estomatitis vesicular fluorescente rojo (VSV). En el seno subcapsular del ganglio linfático drenado, el virus rojo se localiza simultáneamente de forma exclusiva con macrófagos CD169+. (B) Micrografía electrónica de un macrófago de ganglio linfático (Mph) y un linfocito B folicular (B1) por debajo del lecho del seno subcapsular (SCSf) 30 minutos después de la inyección VSV en la superficie y en un fagolisosoma del Mph y en la interfase entre las células Mph y los linfocitos B (puntas de flecha). (C) La inyección de VSV en la almohadilla plantar de ratones no tratados (B6) da como resultado una rápida regulación por defecto de la IgM expresada sobre la superficie en linfocitos B específicos de virus, un signo de activación de linfocitos B. Agotamiento de SCS-Mph después de la inyección en la almohadilla plantar de la activación de linfocitos B impedida por liposomas de clodronato (CLL), indicando que los SCS-Mph son esenciales para presentar antígenos particulados a linfocitos B. *Figura 3:* Un nanotransportador de liposomas ilustrativos comparativo con un agente inmunomodulador lipófilo incorporado en la membrana, y un agente inmunomodulador hidrófilo encapsulado en el liposoma.

35 *Figura 4:* Un nanotransportador de liposomas estabilizado con nanopartículas ilustrativo comparativo con un agente inmunomodulador lipófilo incorporado en la membrana y un agente inmunomodulador hidrófilo encapsulado en el liposoma.

40 *Figura 5:* Un nanotransportador de liposomas ilustrativos comparativo con un agente inmunomodulador lipófilo incorporado en la membrana, y un agente inmunomodulador hidrófilo encapsulado en la nanopartícula polimérica.

45 *Figura 6:* Un nanotransportador de polímeros-liposomas estabilizado con nanopartículas ilustrativo comparativo con un agente inmunomodulador lipófilo incorporado en la membrana y un agente inmunomodulador hidrófobo encapsulado en la nanopartícula polimérica.

50 *Figura 7:* Un nanotransportador de polímeros-liposomas ilustrativo comparativo que contiene micelas inversas con un agente inmunomodulador lipófilo incorporado en la membrana, y un agente inmunomodulador hidrófilo encapsulado en las micelas inversas.

55 *Figura 8:* Un nanotransportador de liposomas-polímeros estabilizado con nanopartículas ilustrativo comparativo y que contiene micelas inversas con un agente inmunomodulador lipófilo incorporado en la membrana y un agente inmunomodulador hidrófilo encapsulado en el interior del liposoma.

60 *Figura 9:* Un nanotransportador polimérico estabilizado con lípidos ilustrativo comparativo con un agente inmunomodulador hidrófilo conjugado con la monocapa lipídica, y un agente inmunomodulador hidrófobo encapsulado en el interior del núcleo polimérico.

65 *Figura 10:* Un nanotransportador polimérico estabilizado con lípidos ilustrativo comparativo que contiene micelas inversas con un agente inmunomodulador hidrófilo conjugado con la monocapa lipídica, y un agente inmunomodulador hidrófilo encapsulado en el interior del núcleo polimérico.

Figura 11: Captura de VSV transmitidos por ganglios linfáticos mediante macrófagos SCS. (A) micrografías MP-IVM de VSV en LN propliteal (números: minutos después de la inyección de la almohadilla plantar; barra de escala: 100 μ m). (B) acumulación de VSV en un receptor de C57BL/6→Act(EGFP)3 horas después de la inyección (barra de escala: 50 μ m). (C) Micrografías electrónicas de VSV en LN 5 minutos después de la inyección. La micrografía central se muestra esquemáticamente (izquierda) a un mayor aumento (derecha). Las puntas de flechas identifican partículas VSV (barras de escala: 2 μ m). (D) Micrografías confocales de LN drenando VSV (30 minutos). Barras de escala: 100 μ m (izquierda), 15 μ m (derecha). (E) Títulos de VSV en LN popliteal 2 horas después de la inyección en ratones silvestres, con agotamiento de CLL o deficientes en C3. ***: $p < 0,001$ (ANOVA bilateral, ensayo posterior de Bonferroni). (F) captura de VSV en ratones DH- LMP2a. *: $p < 0,05$ (test de la t sin emparejar). (G) títulos de VSV tras la inyección en la almohadilla plantar en ratones no tratados y tratados con CLL (uno de dos experimentos similares; $n = 3$). ProxLN: inguinal, LN paraaórticos; BrachLN: LN braquial. (H) Títulos víricos en ganglios linfáticos, bazo y sangre tras la canulación de TD; *: $p < 0,05$ (test de la t sin emparejar). Las barras horizontales en (E-H) indican las medias.

Figura 12: Caracterización de macrófagos CD169+ en LN periféricos. (A-C) Análisis de expresión del marcador de linajes de células mononucleares combinadas procedentes de LN ratones C57BL/6 no expuestos al tratamiento anteriormente. (A) Tras clasificar en la población de CD169+ (panel intermedio), se analizaron las células para la expresión de dos marcadores superficiales asociados a macrófagos, I-Ab (MHC de clase II) y CD11b (panel inferior). Se muestra en la parte superior la tinción con un isotipo control para un anticuerpo dirigido contra CD169. (B) Las células CD169+I-Ab+CD11b+ se analizaron adicionalmente para la expresión de CD68, F4/80, CD11c, y Gr-1. Se diseñaron clasificaciones para identificar células marcadoras+, excepto para la tinción de CD11c donde el marcador se situó para identificar células dendríticas CD11c^{high} convencionales (superposición). Los números indican el porcentaje de células CD169+I- Ab+CD11b+ en la clasificación de histogramas. Los datos son representativos de 3-5 experimentos con resultados similares. (C) Análisis cuantitativo de datos en el panel (B), las barras de errores representan la SEM. (D-G) Micrografías confocales de LN popliteales procedentes de ratones C57BL/6 no expuestos a tratamiento anteriormente que muestran la expresión simultánea de marcadores seleccionados de células CD169+ (puntas de flecha). Barras de escala: 125 μ m en la columna de la izquierda y 20 μ m en las otras columnas.

Figura 13: Cambios morfológicos en LN popliteales tras el tratamiento con CLL. (A) Micrografías confocales de LN popliteales (las tres hileras superiores) y bazos (hileras inferior) de ratones control no tratados (-CLL, columna de la izquierda) y animales que habían recibido inyecciones de CLL en las almohadillas plantares 6-10 días antes. El tratamiento con CLL agotó los macrófagos CD169+ en los LN (hileras superior), pero no en los bazos; las células endoteliales linfáticas medulares Lyve-1+ (segunda hilera) y células dendríticas CD11c^{high} corticales (tercera hilera) no se vieron afectadas. (B) Frecuencia del subconjunto celular en LN popliteales con y sin tratamiento con CLL, los datos proceden de ratones $n = 3$ y muestra la media \pm SEM; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$; test de la t de student sin emparejar. (C) Frecuencia de diferentes subconjuntos de leucocitos I-Ab+CD11b+ en LN popliteales a los 6-10 días después de la inyección en la almohadilla plantar de 50 μ l CLL. Cada símbolo representa LN popliteales combinados procedentes de un ratón. Se evaluaron las frecuencias de subconjuntos entre las células mononucleares totales en LN popliteales mediante citometría de flujo tras clasificar en células I- Ab+CD11b+ como se muestra en la Figura 12A. (D) Análisis inmunohistoquímico de LN popliteales sin tratamiento (-CLL) o 7 días después de la inyección en la almohadilla plantar de CLL (+CLL). Barras de escala: 300 μ m (E) Ultraestructura de SCS en un LN popliteal representativo 7 días después del tratamiento con CLL y 5 minutos después de la inyección de la almohadilla plantar de 20 μ g de VSV-IND. Señalar la completa ausencia de macrófagos SCS y de partículas víricas. Barra de escala: 2 μ m.

Figura 14: Retención de virus fluorescentes y de nanopartículas de látex en LN popliteales. (A) Micrografías confocales de LN popliteales 30 minutos después de la inyección en la almohadilla plantar de adenovirus marcado con Alexa-568 (AdV). Se tiñeron secciones congeladas con FITC- α -CD169 y Alexa-647- α -B220 para identificar linfocitos B. Barras de escala: 100 μ m (panel de la izquierda) y 15 μ m (panel de la derecha). (B) Micrografías electrónicas de transmisión de partículas de AdV capturadas por un macrófago SCS. El panel superior muestra un dibujo esquemático anotado de un panorama general con un aumento bajo (panel intermedio). El área recuadrada en el panel intermedio está alargada en el panel inferior, las puntas de flecha denotan las partículas de AdV esféricas densas en electrones, Barras de escala: 2 μ m (panel superior e intermedio) y 1 μ m (panel inferior). (C-D) Micrografías confocales de LN popliteales procedentes de ratones C57BL/6 30 minutos después de la inyección en la almohadilla plantar de 20 μ g de AdV inactivado con UV marcado con Alexa-568 (C) o VV (D). Los virus fluorescentes acumulados en los SCS corticales por encima de los folículos B se identificaron con la tinción de FITC - α -B220 y también en la médula, donde los virus no estaban unidos solo por los macrófagos CD169+, sino también por células endoteliales linfáticas LYVE-1+. Las barras de escala indican 125 μ m (panel de la izquierda) y 25 μ m (panel de la derecha). (E) Micrografía confocal de un LN popliteal 30 minutos después de la inyección en la almohadilla plantar de la extremidad de VSV marcado con Alexa-568 y aproximadamente 10^{11} fluoesferas de Crimson (200 nm de diámetro). Las secciones de LN congeladas se contratiñeron con FITC- α - CD169. Señalar que las perlas de látex, a diferencia de VSV, se tiñeron poco en los LN drenantes. Barra de escala: 125 μ m.

Figura 15: Efecto de la inyección de CLL en la almohadilla plantar sobre la distribución de VSV en LN drenados. Las micrografías confocales muestran la localización de las partículas VSV fluorescentes en LN popliteales sin (A) o (B) 7 días después del tratamiento con CLL. Se identificaron los folículos B mediante tinción con FITC- α -B220. En la médula (área recuadrada), Los VSV se unieron mediante células LYVE-1+ que no se vieron afectadas por el tratamiento con CLL. Barras de escala: 125 μ m (columna izquierda) and 25 μ m (columna derecha).

Figura 16: Macrófagos SCS presentes en Adv derivado de ganglios linfáticos a linfocitos B foliculares. (A) micrografía confocal de macrófagos CD169⁺ los SCS por encima de un folículo B en un LN popliteal. Se contratiñeron secciones congeladas con aglutinina de germen de trigo (WGA) para identificar la matriz extracelular y con α - B220 para detectar linfocitos B. Señalar que algunos linfocitos B residen en los SCS y un linfocito B parece migrar entre el folículo y los SEC (punta de flecha). Barra de escala: 25 μ m. (B) Micrografía electrónica y (C) dibujo esquemático de un macrófago SCS y las células que lo rodean en un LN popliteal 30 minutos después de la inyección de Adv en la almohadilla plantar. Barra de escala: 2 μ m. Los dibujos de los recuadros en (C) indican las área de mayor aumento que se muestran en los paneles (D) y (E). Estos paneles muestran dos ejemplos de partículas de Adv en la interfase entre los macrófagos SCS y los linfocitos B (puntas de flecha). Los asteriscos denotan otras partículas de Adv asociadas a macrófagos. Barras de escala: 500 nm.

Figura 17: La transferencia mediada por macrófagos de VSV transmitidos por los ganglios linfáticos a través de la superficie de los SCS altera el comportamiento de los linfocitos B específicos de virus. (A) Micrografías electrónicas y dibujo esquemático (intermedio) que muestra un macrófago penetrando la superficie del SCS de un LN popliteal 30 minutos después de la inyección de VSV. Barras de escala: 10 μ m (izquierda) y 2 μ m (derecha). Flecha: vacuola con VSV digerido. Puntas de flecha: viriones en la zona de contacto entre macrófagos y linfocitos B. (B) MP-IVM de linfocitos B policlonales y linfocitos B V110YEN en LN popliteales. Barras de escala: 50 μ m. (C) Relaciones regionales de linfocitos B V110YEN/linfocitos B del control tras la inyección de VSV. Los resultados proceden de un grupo de 3 películas. (D,E) Localización de linfocitos B V110YEN en LN popliteales con respecto a los SCS. **: $p < 0,01$ (ANOVA monolateral con ensayo posterior de Bonferroni).

Figura 18: Características de serotipos de VSV y linfocitos B V110YEN específicos de VSV-IND. (A) geles SDS-PAGE (12 %) de lisados de VSV purificados. Parte superior: VSV-IND y VSV-NJ. Las proteínas N y P migran simultáneamente en VSV-NJ, se muestran entre paréntesis los pesos moleculares aproximados. (B) Unión de VSV-IND marcados con Alexa-488 (hilera intermedia) o VSV-NJ (hilera inferior) a linfocitos B procedentes de ratones C57BL/6 (columna izquierda) o ratones V110YEN (columna derecha). La hilera superior muestra la tinción del control con un anticuerpo antiidiotípico 35.61 a la BCR V1110YEN (Dang y Rock, 1991, J. Immunol., 146:3273). (C) Flujo de calcio intracelular en CD43^{neg} purificado, los linfocitos B cargados con Fluo-LOJO proceden de ratones V110YEN (hilera superior) o de ratones C57BL/6 (hilera inferior). Se recogieron los eventos continuamente en el tiempo, los asteriscos indican el punto temporal cuando se añadieron los anticuerpos o el virus. Se utilizaron partículas de virus a 1000/linfocito B, anti-IgM-(Fab)₂ a 10 μ g/10⁶ linfocitos B. (D) Ensayo de neutralización para la Ig total y la IgG en suero de ratones C57BL/6 4 y 10 días después de la inmunización mediante inyección en la almohadilla plantar de 10 μ g UV-VSV o UV-VSV-AlexaFluor- 488-IND. (E) Flujo de calcio en linfocitos B V110YEN expuestos a sobrenadantes procedentes de soluciones madre de VSV. Se generó el sobrenadante mediante ultracentrifugación a través de un amortiguador de sacarosa que dio como resultado una reducción de aproximadamente 10.000 veces en los títulos víricos y se utilizaron sobre linfocitos B tanto sin diluir (parte superior derecha) como a una dilución 1:100 (parte inferior derecha). Como control, se diluyó una solución madre de VSV a títulos víricos equivalentes (MOI; paneles de la izquierda). Los resultados demuestran la presencia de VSV-G antigénico que no está asociado con partículas víricas en la preparación vírica de los inventores.

Figura 19: Adhesión inducida por VSV de linfocitos B V110YEN a ICAM-1 y VCAM-1. (A,B) adhesión de linfocitos B V110YEN no expuestos al tratamiento anteriormente y VSV-IND activados (30 minutos de exposición) a placas de plástico revestidas con las concentraciones indicadas de ICAM- 1-Fc (A) o VCAM-1-Fc (B) recombinante. Se muestran los datos combinados de dos experimentos por triplicado. Las barras horizontales representan las medias. (C, D) micrografías confocales de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en LN popliteales de ratones C57BL/6. Barras de escala: 50 μ m. (E) Adhesión de linfocitos B V110YEN naturales no expuestos anteriormente a tratamiento purificados y linfocitos B V110YEN a placas de plástico revestidas con las concentraciones equivalentes de ufp indicadas de VSV-IND inactivadas con UV. Los datos representan las medias \pm SEM de los triplicados.

Figura 20: Se requieren macrófagos SCS para la activación temprana de los linfocitos B específicos de VSV en los LN. (A) la micrografía confocal muestra la localización de MHC-II con VSV-IND (30 minutos después de la inyección) en linfocitos B V110YENxMHCII(EGFP) en los SCS (punta de flecha), sin profundizar en el folículo (asterisco). Barra de escala: 25 μ m. (B) Distancia de linfocitos B V110YENxMHCII(EGFP) exentos de VSV y asociados a VSV a los SCS; Líneas horizontales: medianas. (C) Expresión cinética de BCR en V110YEN y (D) linfocitos B policlonales tras la inyección en la almohadilla plantar de VSV-IND. (E) Expresión de BCR en células V110YEN en LN popliteales tratados o no tratados con CLL tras la inyección con VSV-IND (20 μ g). Las intensidades promedio de la fluorescencia se normalizaron para valores exentos de virus (línea punteada). Medias \pm SEM (3-5 ratones). (F) Micrografía confocal de linfocitos B V110YEN en LN popliteales del control y (G) tratados con CLL 6 horas después de la inyección de VSV-IND (0,4 μ g). Barra de escala: 125 μ m. (H) Frecuencia de linfocitos B V110YEN en los bordes T/B y en los folículos 6 horas después de la inyección de VSV-IND a las dosis indicadas. Medias \pm SEM; n = 3-4 folículos/2 ratones; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (test de la t).

Figura 21: Motilidad de linfocitos B V110YEN en LN drenadas tras la inyección del virus. Medianas de las velocidades instantánea 3D de los linfocitos B naturales (triángulos) y los linfocitos B V110YEN (círculos) en los folículos profundos y en los folículos superficiales de los SCS aproximadamente 5-35 min. después de la inyección en la almohadilla plantar de VSV. Las barras horizontales representan las medias; *: $p < 0,05$; **: $p < 0.01$ (ANOVA monolateral con ensayo posterior de Bonferroni). señalar que los linfocitos B específicos reducen la velocidad a través del folículo completo, probablemente como una consecuencia de los VSV-G libres en la preparación de los inventores (véase la Figura 18). Los experimentos del control mostraron unos parámetros de

motilidad de los linfocitos B similares en los popLN tratados y no tratados con CLL.

Figura 22: Curso temporal de activación de la inducción del marcador en LN que drenan y que no drenan virus en linfocitos B V110YEN tras la inyección de VSV-IND. Se etiquetaron fluorescentemente linfocitos B V110YEN con CMTMR y se transmitieron a ratones que no habían experimentado anteriormente tratamiento que se inyectaron 18 horas después con 20 µg de VSV-IND inactivado con UV (tiempo 0 horas). Se recogieron LN popliteales drenantes (popLN) y un LN braquial distal (brachLN) tras los intervalos de tiempo indicados para generar suspensiones de células individuales. Se evaluó la expresión de CD69 y CD86 en linfocitos B mediante citometría tras la clasificación en (A) células B220+CMTMR+V110YEN o (B) linfocitos B del control endógenos B220+CMT- MR.

Figura 23: Micrografías confocales (columnas izquierda e intermedia) y micrografías de MP-IVM (columna derecha) de LN popliteales de ratones que han recibido transferencias adoptivas de una mezcla de linfocitos B V110YEN marcados con CMTMR y linfocitos B policlonales marcados con CMAC (en la columna derecha). En el día siguiente, Se inyectaron 20 µg de VSV-IND inactivado con UV en la almohadilla plantar en LN popliteales drenantes que se preparan quirúrgicamente tanto para MP-IVM como se recogieron para el análisis confocal de secciones congeladas en los puntos temporales indicados. Las imágenes de MP-IVM muestra que linfocitos específicos de VSV, pero no linfocitos B policlonales entra en contacto con VSV en el SCS tan pronto como 30 minutos después de la inyección del virus. Linfocitos B V110YEN relocalizados en el borde T/B a las 6 horas después de la inyección. Barras de escala: 150 µm en la columna izquierda y 25 µm en las otras columnas..

Figura 24: Direccionamiento *in vivo* de SCS-Mph usando fragmentos de Fc procedentes de IgG humana. (A) Los histogramas FACS de la izquierda documentan la unión de nanopartículas PEG-PLGA fluorescentes (~100 nm diámetro) a macrófagos de ganglios linfáticos. (B) la nanopartícula FC (NP) se dirige a SCS-Mph y las células dendríticas foliculares.

Figura 25: Identificación del receptor CX3CR1 de las quimioquinas (receptor de la fractalkina) sobre macrófagos en el seno subcapsular del ganglio linfático (SCS), pero no en los macrófagos en la médula. La micrografía de la derecha es una proyección 3D de un ganglio linfático procedente de un ratón doblemente inactivado donde la proteína fluorescente verde (GFP) se expresa en el locus CX3CR1, mientras que la proteína fluorescente roja (RFP) indica la expresión de otro receptor de quimioquinas, CCR2. SCS-Mph son fácilmente identificables por su prominente fluorescencia verde, mientras que los macrófagos medulares expresan principalmente RFP.

Figura 26: SCS-Mph expresa el receptor de la quimioquina CX3CR1. La gráfica muestra una representación gráfica de FACS de una suspensión de células individuales procedente de un ganglio linfático de un ratón inactivado que se diseñó mediante ingeniería genética para expresar GFP a partir de locus de CX3CR1. Se identificaron los SCS-MPh tiñendo con un receptor soluble, CRFc, que se une a los macrófagos en el SCS, pero no en la médula. Las células que expresan CX3CR1 negativo para CRFc (es decir, elevados niveles de GFP) son células dendríticas convencionales que expresan el receptor de la quimioquina.

Figura 27: Micrografías fluorescentes de secciones congeladas de ganglios linfáticos popliteales de ratón 24 h después de la inyección en la almohadilla plantar de perlas de látex de 0,2 µm de diámetro modificadas en la superficie tanto con amina (panel izquierdo o intermedio) como con restos carboxi (panel derecho). Ambos conjuntos de perlas se adquirieron de Invitrogen (n.º de Cat F8763 y F8805). Las secciones de la izquierda y la derecha se contratiñeron con anticuerpo dirigido contra CD169. Las imágenes se orientaron de tal manera que la médula (tinción débil, difusa, con anticuerpo dirigido contra CD169) se orienta a la derecha y la región del seno subcapsular (SCS)(anticuerpo dirigido contra CD169 brillante) se orienta a la izquierda. Señalar que las partículas modificadas con amina roja se localizan prominentemente en el SCS, mientras que las perlas modificadas con carboxi azul se retiene principalmente en la médula.

Figura 28: (A) Las partículas dirigidas que transportan antígeno son muy inmunógenas e inducen títulos de anticuerpo elevados. (B) La respuesta inmunitaria inducida estimulada por las vacunas de nanopartículas confiere una potente protección de una dosis letal de VSV.

Figura 29: Activación de linfocitos T *in vivo* T mediante nanopartículas inmunomoduladoras.. (A) Efecto de NP sobre la activación de linfocitos T CD4. (B) Efecto de NP sobre la respuesta de los linfocitos CD8 mezclados con el adyuvante CpG (agonista de TLR9). (C) Efecto del adyuvante encapsulado simultáneamente sobre la activación de linfocitos T CD8.

Figura 30: Muestra una estrategia de conjugación de la nicotina ilustrativa.

Figura 31: Muestra una estrategia de conjugación de R848 ilustrativa.

Definiciones

Sustancia adictiva: Como se usa en el presente documento, el término "sustancia adictiva" es cualquier sustancia tomada por un sujeto (por ejemplo, un ser humano) con fines diferentes de aquellos para los cuales se indica o en una manera o en cantidades diferentes que las prescritas por un médico. Una sustancia adictiva es un fármaco, tal como una droga ilegal. Una sustancia adictiva incluye un fármaco que se vende sin receta. Una sustancia adictiva incluye un fármaco prescrito. Una sustancia adictiva incluye una sustancia que crea dependencia. Una sustancia adictiva puede tener efectos que alteran el estado de ánimo, y, por lo tanto, incluye inhaladores y disolventes. Una sustancia adictiva incluye aquella que no tiene efectos que alteran el estado del ánimo o proedades de intoxicación, y, por lo tanto, incluye esteroides anabólicos. Las sustancias adictivas incluyen cannabinoides (por ejemplo, hachís, marihuana), depresores (por ejemplo, barbitúricos, benzodiacepinas, flunitrazepam (Rohipnol), GHB, metacualona (sedantes)), anestésicos disociativos (por ejemplo, ketamina, PCP), alucinógenos (por ejemplo, LSD, mescalina, psilocibina), opioides y derivados de morfina (por ejemplo, codeína, fentanilo, heroína, morfina, opio), estimulantes

(anfetaminas, cocaína, Éxtasis (MDMA), metanfetamina, metifenidato (Ritalin), nicotina), esteroides anabólicos, e inhaladores. Una sustancia adictiva puede estar incluida en un nanotransportador en forma de la molécula completa o una parte de la misma.

- 5 *Sustancia que crea dependencia:* Como se usa en el presente documento, el término "sustancia que crea dependencia" es una sustancia que produce obsesión, compulsión, o dependencia física o dependencia psicológica. Una sustancia que crea dependencia incluye una droga ilegal. Una sustancia que crea dependencia incluye un fármaco que se vende sin receta. Una sustancia que crea dependencia incluye un fármaco prescrito. Las sustancias que crea dependencia incluyen cocaína, heroína, marihuana, metanfetaminas, y nicotina. La sustancia que crea dependencia se puede incluir en un nanotransportador en forma de la molécula completa o una parte de la misma.

15 *Aminoácidos:* Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido", en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que se puede incorporar en una cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, un aminoácido tiene la estructura general $H_2N-C(H)(R)-COOH$. En algunas realizaciones, un aminoácido es un aminoácido que se produce naturalmente. En algunas realizaciones, un aminoácido es un aminoácido sintético; en algunas realizaciones, un aminoácido es un D-aminoácido; en algunas realizaciones, un aminoácido es un L-aminoácido. "Aminoácido estándar" o "aminoácido natural" se refiere a cualquiera de los veinte L-aminoácidos estándar que se encuentran en los péptidos que se producen naturalmente. "Aminoácido no estándar" se refiere a cualquier aminoácidos, diferentes de los aminoácidos estándar, independientemente de si se prepara sintéticamente o se obtiene a partir de una fuente natural. Como se usa en el presente documento, "aminoácido no natural" abarca los aminoácidos producidos o modificados químicamente, incluyendo, aunque no de forma limitativa, las sales,, los derivados de aminoácidos (tales como amidas), y/o las sustituciones. Los aminoácidos, incluyendo los aminoácidos de los extremos carboxi y/o amino de los péptidos, pueden estar modificados mediante metilación, amidación, acetilación, y/o sustitución con otros grupos químicos que pueden alterar la semivida en circulación del péptido sin afectar adversamente su actividad. Los aminoácidos pueden participar en un enlace disulfuro. El término "aminoácido" se usa de manera indistinta con "resto aminoácido", y puede referirse a un aminoácido libre y/o a un resto aminoácido de un péptido. Será evidente a partir del contexto en el que el término se usa si se refiere a un aminoácido libre o a un resto de un péptido.

30 *Animal:* Como se usa en el presente documento, el término "animal" se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a seres humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a animales no humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En determinadas realizaciones, el animal no humano es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, ganado bovino, un primate, y/o un cerdo). En algunas realizaciones, los animales incluyen, pero sin limitación, mamíferos, pájaros, reptiles, anfibios, peces, y/o gusanos. En algunas realizaciones, Un animal puede ser un animal transgénico, un animal diseñado mediante ingeniería genética, y/o un clon.

40 *Anticuerpo:* Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier inmunoglobulina, tanto natural como producida de forma completa o parcialmente sintética. Todos sus derivados que mantienen una capacidad de unión específica se incluyen también en el término. El término cubre también cualquier proteína que tenga un dominio de unión que sea homólogo u homólogo en última instancia a un dominio de unión de la inmunoglobulina. Dichas proteínas pueden derivarse de fuentes naturales, o producidas de forma parcial o completamente sintética. Un anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Un anticuerpo puede ser un miembro de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo cualquiera de las clases humanas: IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE. Como se usa en el presente documento, los términos "fragmento de anticuerpo" o "porción característica de un anticuerpo" se usan de forma indistinta y se refieren a cualquier derivado de un anticuerpo que es menor que la longitud completa. Un fragmento de anticuerpo puede retener al menos una porción significativa de la capacidad de unión específica del anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de dichos fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, diacuerpos dsFv, y fragmentos Fd. Fragmento de anticuerpo incluye también los fragmentos Fc. Un fragmento de anticuerpo puede producirse mediante cualquier medio. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede producirse enzimática o químicamente mediante fragmentación de un anticuerpo intacto y/o este puede producirse de forma recombinante a partir de un gen que codifica la secuencia parcial del anticuerpo. De forma alternativa o adicional, un fragmento de anticuerpo puede producirse de forma completa o parcialmente sintética. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un fragmento de anticuerpo monocatenario. De forma alternativa o adicional, un fragmento de anticuerpo puede comprender múltiples cadenas que se unen juntas, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un complejo multimolecular. un fragmento de anticuerpo funcional comprenderá normalmente al menos aproximadamente 50 aminoácidos y más normalmente comprenderá al menos aproximadamente 200 aminoácidos.

60 *Aproximadamente:* Como se usa en el presente documento, los términos "aproximadamente" o "alrededor de" en referencia a un número se toman generalmente para incluir números que es encuentran comprendidos en un intervalo del 5 %, 10 %, 15 %, o 20 % en cualquier dirección (mayor que o menor que) el número, a no ser que se indique otra cosa o sea evidente de otra forma a partir del contexto (excepto cuando dicho número sería menor de 0 % o exceda un 100 % de un valor posible).

65

Asociada con: Como se usa en el presente documento, el término "asociado con" se refiere al estado de dos o más entidades que se unen mediante una interacción covalente o no covalente, directa o indirecta. En algunas realizaciones, una asociación es covalente. En algunas realizaciones, una asociación covalente está mediada por un resto enlazador. En algunas realizaciones, una asociación es no covalente (por ejemplo, interacciones de carga, interacciones de afinidad, coordinación metálica, adsorción física, interacciones hospedador-huésped, interacciones hidrófobas, interacciones de apilado de TT, interacciones de enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electroestáticas, interacciones dipolo-dipolo, etc.). Por ejemplo, en algunas realizaciones, una entidad (por ejemplo, un agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, un agente inmunoestimulador, una nanopartícula, etc.) se puede asociar covalentemente con un nanotransportador de vacunas. En algunas realizaciones, una entidad (por ejemplo, un agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, un agente inmunoestimulador, una nanopartícula, etc.) se puede asociar de forma no covalente con un nanotransportador de vacunas. Por ejemplo, la entidad puede asociarse con la superficie de, encapsularse en el interior, rodearse por, y/o distribuirse en la totalidad de una bicapa lipídica, una monocapa lipídica, una matriz polimérica, etc. de un nanotransportador de vacunas inventivo.

Biocompatible: Como se usa en el presente documento, el término "biocompatible" se refiere a sustancias que no son tóxicas para las células. En algunas realizaciones, se considera que una sustancia es "biocompatible" si su adición a las células *in vivo* no induce inflamación y u otros efectos adversos *in vivo*. En algunas realizaciones, se considera que una sustancia es biocompatible si su adición a las células *in vitro* o *in vivo* da como resultado menos de o igual a aproximadamente 50 %, aproximadamente un 45 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 35 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente 5 % o menos de aproximadamente 5 % de muerte celular.

Biodegradable: Como se usa en el presente documento, el término "biodegradable" se refiere a sustancias que se degradan en condiciones fisiológicas. En algunas realizaciones, una sustancia biodegradable es una sustancia que se descompone mediante maquinaria celular. En algunas realizaciones, una sustancia biodegradable es una sustancia que se descompone mediante procesos químicos.

Antígeno de linfocitos B: Como se usa en el presente documento, el término "antígeno de linfocitos B" se refiere a cualquier antígeno que es reconocido y estimula una respuesta inmunitaria en un linfocito B. En algunas realizaciones, un antígeno que es un antígeno de linfocitos B es también un antígeno de linfocitos T. En determinadas realizaciones, el antígeno de linfocitos B no es también un antígeno de linfocitos T. En determinadas realizaciones, cuando un nanotransportador, tal como se proporciona en el presente documento, comprende un antígeno de linfocitos B y un antígeno de linfocitos T, el antígeno de linfocitos B y el antígeno de linfocitos T no son el mismo antígeno, aunque cada uno de los antígenos de linfocitos B y linfocitos T puede ser, en algunas realizaciones, tanto un antígeno de linfocitos B como un antígeno de linfocitos T. En otras realizaciones, el antígeno de linfocitos B y el antígeno del linfocitos T del nanotransportador son el mismo.

Tipo de célula: Como se usa en el presente documento, el término "tipo de célula" se refiere a una forma de célula que tiene un conjunto distinto de características morfológicas, bioquímicas, y/o funcionales que definen el tipo de célula. Una persona experta en la materia reconocerá que se puede definir un tipo de célula con niveles variables de especificidad. Por ejemplo, los linfocitos T y los linfocitos B son tipos de células distintos, que se pueden distinguir entre sí pero que comparten determinadas características que son características de tipo de célula "linfocito" más amplio del cual ambos son miembros. Normalmente, células de diferentes tipos pueden distinguirse entre sí basándose en su expresión diferencial de varios genes que se denominan en la técnica "marcadores" de un tipo o tipos de célula concretos (por ejemplo, tipos de células de un linaje concreto). En algunas realizaciones, las células de diferentes tipos pueden distinguirse entre sí basándose en sus funciones diferenciales. Un "marcador específico de un tipo de célula" es un producto génico o su versión modificada que se expresa a un nivel significativamente mayor por uno o más tipos de células que por todos o la mayoría de tipos de células diferentes y cuya expresión es característica de este tipo de célula. Muchos marcadores específicos de tipos de células se reconocen como tales en la técnica.

Agente peligroso para el medio ambiente: Como se usa en el presente documento, el término "agente peligroso para el medio ambiente" se refiere a cualquier sustancia peligrosa que se encuentra en el medio ambiente. Dichas sustancias se cree generalmente que poseen un riesgo elevado. Los agentes peligrosos para el medio ambiente incluyen sustancias que se piensa que poseen un riesgo elevado aunque pueden no poseer realmente un riesgo. Los agentes peligrosos para el medio ambiente incluyen arsénico, plomo, mercurio, cloruro de vinilo, bifenilos policlorados, benceno, hidrocarburos aromáticos policíclicos, cadmio, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, cloroformo, DDT, P,P', aroclor 1254, aroclor 1260, dibenzo(a,h)antraceno, tricloroetileno, dieldrina, cromo hexavalente y DDE, P,P'. Un agente peligroso para el medio ambiente se puede incluir en un nanotransportador en forma de la molécula completa o una parte de la misma.

In vitro: Como se usa en el presente documento, el término "*in vitro*" se refiere a eventos que se producen en un entorno artificial, *por ejemplo*, en un tubo de ensayo o un reactor, en un cultivo celular, etc., en lugar de en el interior de un organismo (por ejemplo, animal, vegetal, y/o un microbio).

In vivo: Como se usa en el presente documento, el término "*in vivo*" se refiere a eventos que se producen en el interior de un organismo (por ejemplo, animal, vegetal, y/o un microbio).

5 *Agente inmunoestimulador*: Como se usa en el presente documento, el término "agente inmunoestimulador" se refiere a un agente que modula una respuesta inmunitaria a un antígeno pero no es el antígeno o derivado a partir del antígeno. "Modular", como se usa en el presente documento, se refiere a inducir, potenciar, dirigir, o redirigir una respuesta inmunitaria. Dichos agentes incluyen agentes inmunoestimuladores que estimulan (o refuerzan) una respuesta inmunitaria a un antígeno pero, como se ha definido anteriormente, no es el antígeno o derivado a partir del antígeno. Los agentes inmunoestimuladores, por lo tanto, incluyen adyuvantes. En algunas realizaciones, el agente inmunoestimulador está sobre la superficie del nanotransportador y está encapsulado en el nanotransportador. En algunas realizaciones, el agente inmunoestimulador sobre la superficie del nanotransportador es diferente del agente inmunoestimulador encapsulado en el nanotransportador. En algunas realizaciones, el nanotransportador comprende más de un tipo de agentes inmunoestimuladores. En algunas realizaciones, el más de un tipo de agente inmunoestimulador actúa en diferentes rutas. Los ejemplos de agentes inmunoestimuladores incluyen aquellos proporcionados en otra parte del presente documento.

20 *Ácido nucleico*: Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico", en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que está o puede incorporarse en una cadena de oligonucleótido. En algunas realizaciones, un ácido nucleico es un compuesto y/o sustancia que está o puede incorporarse en una cadena de oligonucleótido mediante un enlace fosfodiéster. En algunas realizaciones, "ácido nucleico" se refiere a restos de ácido nucleico individuales (por ejemplo, nucleótidos y/o nucleósidos). En algunas realizaciones, "ácido nucleico" se refiere a una cadena de oligonucleótido que comprende restos de ácido nucleico individuales. Como se usa en el presente documento, los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" se pueden usar de manera indistinta. En algunas realizaciones, "ácido nucleico" abarca ARN así como ADN monocatenario y/o bicatenario y/o ADNc. Además, los términos "ácido nucleico", "ADN", "ARN", y/o términos similares incluyen análogos de ácido nucleico, es decir, análogos que tienen una estructura distinta a fosfodiéster. Por ejemplo, los denominados "ácidos nucleicos peptídicos", que se conocen en la técnica y que tienen enlaces peptídicos en vez de los enlaces fosfodiéster en la estructura, están dentro del alcance de la presente invención. El término "secuencia de nucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y/o codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y/o ARN pueden incluir intrones. Los ácidos nucleicos pueden purificarse a partir de fuentes naturales, producidas utilizando sistemas de expresión recombinante y purificarse opcionalmente, sintetizarse químicamente, etc. Cuando sea adecuado, *por ejemplo*, en el caso de moléculas sintetizadas químicamente, los ácidos nucleicos pueden comprender análogos de nucleósidos tales como análogos que han modificado químicamente bases o azúcares, modificaciones de la estructura, etc. Una secuencia de ácido nucleico se presenta en la dirección 5' a 3' a no ser que se indique de otra forma. El término "segmento de ácido nucleico" se usa en el presente documento para referirse a una secuencia de ácido nucleico que es una parte de una secuencia de ácido nucleico más larga. En muchas realizaciones, un segmento de ácido nucleico comprende al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos. En algunas realizaciones, un ácido nucleico es o comprende nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina, y desoxicitidina); análogos de nucleósidos (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolopirimidina, 3-metil adenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinil-citidina, C-5 propinil-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinilcitidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-desazaadenosina, 7-deazaguanosine, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina, y 2-tiocitidina); bases químicamente modificadas; bases biológicamente modificadas (por ejemplo, bases metiladas); bases intercaladas; azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa, y hexosa); y/o grupos fosfato modificados (por ejemplo, fosforotioatos y enlaces de 5'-N-fosforamidita).

50 *Partícula*: Como se usa en el presente documento, una "partícula" se refiere a cualquier entidad que tiene un diámetro de menos de 10 micrómetros (μm). Normalmente, partículas que tienen una dimensión más larga dimensión (por ejemplo, diámetro) de 1000 nm o menos. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 300 nm o menos. Las partículas incluyen micropartículas, nanopartículas, y picopartículas. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de 200 nm o menos. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de 100 nm o menos. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de 50 nm o menos. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de 30 nm o menos. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de 20 nm o menos. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de 10 nm o menos. En algunas realizaciones, las partículas pueden ser una matriz de polímeros. En algunas realizaciones, las partículas pueden ser una partícula no polimérica (por ejemplo, una partícula metálica, punto cuántico, cerámica, material inorgánico, hueso, etc.). Las partículas pueden ser también liposomas y/o micelas. Como se usa en el presente documento, el término "nanopartícula" se refiere a cualquier partícula que tenga un diámetro de menos de 1000 nm. Los nanotransportadores tienen un diámetro geométrico medio que es mayor de 50 nm pero menor de 500 nm. En algunas realizaciones, el diámetro geométrico medio de una población de nanotransportadores es aproximadamente 60 nm, 75 nm, 100 nm, 125 nm, 150 nm, 175 nm, 200 nm, 225 nm, 250 nm, 275 nm, 300 nm, 325 nm, 350 nm, 375 nm, 400 nm, 425 nm, 450 nm, o 475 nm. En algunas realizaciones, el diámetro geométrico medio está entre 100-400 nm, 100-300 nm, 100-250 nm, o 100-200 nm. En algunas realizaciones, el diámetro geométrico medio está entre 60-400 nm, 60-350 nm, 60-300 nm, 60-250

- nm, o 60-200 nm. En algunas realizaciones, el diámetro geométrico medio está entre 75-250 nm. En algunas realizaciones, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de los nanotransportadores de una población de nanotransportadores tienen un diámetro que es menor de 500 nm. En algunas realizaciones, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, el 90 % o más de los nanotransportadores de una población de nanotransportadores
- 5 tiene un diámetro que es mayor de 50 nm pero menor de 500 nm. En algunas realizaciones, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, el 90 % o más de los nanotransportadores de una población de nanotransportadores tiene un diámetro de aproximadamente 60 nm, 75 nm, 100 nm, 125 nm, 150 nm, 175 nm, 200 nm, 225 nm, 250 nm, 275 nm, 300 nm, 325 nm, 350 nm, 375 nm, 400 nm, 425 nm, 450 nm, o 475 nm. En algunas realizaciones, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, el 90 % o más de los nanotransportadores de una población de
- 10 nanotransportadores tiene un diámetro que está entre 100-400 nm, 100-300 nm, 100-250 nm, o 100-200 nm. En algunas realizaciones, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, el 90 % o más de los nanotransportadores de una población de nanotransportadores tiene un diámetro que está entre 60-400 nm, 60-350 nm, 60-300 nm, 60-250 nm, o 60-200 nm.
- 15 *Antígeno poco inmunógeno:* Como se usa en el presente documento, el término "antígeno poco inmunógeno" se refiere a un antígeno que no estimula cualquiera o un nivel suficiente de una respuesta inmunitaria deseada. "Suficiente", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de estimular una respuesta inmunitaria detectable o protectora cuando se administra en una composición que no emplea un nanotransportador descrito en el presente documento, por ejemplo, como antígeno libre mezclado con un adyuvante en ausencia de un
- 20 nanotransportador. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria deseada es tratar o prevenir una enfermedad o dolencia. En determinadas realizaciones, la respuesta inmunitaria deseada es aliviar uno o más síntomas de una enfermedad o dolencia. Los antígenos poco inmunógenos incluyen autoantígenos, pequeñas moléculas e hidratos de carbono.
- 25 *Autoantígeno:* Como se usa en el presente documento, el término "autoantígeno" se refiere a una sustancia normal en el cuerpo de un animal que se estimula cuando existe una respuesta inmunitaria contra el antígeno en el animal, puede dar resultado autoinmunidad (por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria). Un autoantígeno puede ser una proteína o péptido, lipoproteína, lípido, hidrato de carbono, o un ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN. Los autoantígenos incluyen enzimas, proteínas estructurales, proteínas secretadas, receptores superficiales
- 30 celulares, y citoquinas. En algunas realizaciones, el autoantígeno es una citoquina, y la citoquina es TNF, IL-1, o IL-6. En algunas realizaciones, el autoantígeno es la proteína de transferencia del éster de colesterol (CETP), una proteína sérica responsable de la transferencia de colesterol a partir de una lipoproteína de alta densidad (HDL) a al colesterol de una lipoproteína de baja densidad (LDL), la proteína A β asociada con Alzheimer, una enzima proteolítica que procesa la forma patológica de la proteína A β , LDL asociado con aterosclerosis, o un correceptor para VIH-1. En algunas realizaciones, la enzima proteolítica que procesa la forma patológica de la proteína A β es la beta secretasa. En algunas realizaciones, el LDL asociado con aterosclerosis está oxidado o mínimamente modificado. En algunas realizaciones, el correceptor de VIH-1 es CCR5.
- 35 *Molécula pequeña:* En general, se entiende en la técnica que una "molécula pequeña" es una molécula orgánica que es menor de aproximadamente 2000 g/mol de tamaño. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es menor de aproximadamente 1500 g/mol o menos de aproximadamente 1000 g/mol. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es menor de aproximadamente 800 g/mol o menos de aproximadamente 500 g/mol. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas son no poliméricas y/o no oligoméricas. Las moléculas pequeñas incluyen no proteínas, no péptidos, o no aminoácidos. Las moléculas pequeñas incluyen ácidos no nucleicos o no nucleótidos.
- 40 Las moléculas pequeñas incluyen no sacáridos o no polisacáridos.
- 45 *Unión específica:* Como se usa en el presente documento, el término "unión específica" se refiere a una asociación física no covalente de un primer y un segundo resto en el que la asociación entre el primer y el segundo restos es al menos 2 veces tan fuerte, al menos 5 veces tan fuerte como, al menos 10 veces tan fuerte como, al menos 50 veces tan fuerte como, al menos 100 veces tan fuerte como, o más fuerte que la asociación de cualquier resto con la mayoría o todos los restos diferentes presentes en el entorno en el que se produce la unión. La unión de dos o más entidades puede considerarse específica si la constante de disociación del equilibrio, K_D , es 10^{-3} M o menor, 10^{-4} M o menor, 10^{-5} M o menor, 10^{-6} M o menor, 10^{-7} M o menor, 10^{-8} M o menor, 10^{-9} M o menor, 10^{-10} M o menor, 10^{-11} M o menor, o 10^{-12} M o menor en las condiciones empleadas, *por ejemplo*, en condiciones fisiológicas tales como las del
- 50 interior de una célula o consistentes con la supervivencia de la célula. En algunas realizaciones, se puede llevar a cabo la unión específica mediante una pluralidad de interacciones más débiles (por ejemplo, una pluralidad de interacciones individuales, en las que cada interacción individual se caracteriza por una K_d de más de 10^{-3} M). En algunas realizaciones, la unión específica, que se puede denominar "reconocimiento molecular", es una interacción de unión saturable entre dos entidades que es dependiente sobre la orientación complementaria de los grupos
- 55 funcionales en cada entidad. Los ejemplos de interacciones de unión específicas incluyen interacciones diana aptámero-aptámero, interacciones antígeno-anticuerpo, interacciones avidina-biotina, interacciones receptor-ligando, interacciones metal-quelato, hibridación entre ácidos nucleicos complementarios, etc.
- 60 *Sujeto:* Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a cualquier organismo al cual se puede administrar una composición de la presente invención, *por ejemplo*, para diagnóstico experimental, y/o fines terapéuticos. Los sujetos típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos tales como ratones, ratas, conejos,
- 65

primates no humanos, y seres humanos) y/o plantas.

Que padecen de: Un individuo que "padece de" una enfermedad, trastorno, y/o dolencia se ha diagnosticados con, puede diagnosticarse con, o expresa uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno, y/o dolencia.

5 *Susceptible a:* Un individuo que es "susceptible a" una enfermedad, trastorno, y/o dolencia que no se ha diagnosticado con y/o puede no presentar síntomas de la enfermedad, trastorno, y/o dolencia. En algunas realizaciones, una enfermedad, trastorno, y/o una dolencia se asocia con una infección microbiana (por ejemplo, infección bacteriana, infección vírica, infección fúngica, infección parasítica, etc.). En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una infección microbiana puede exponerse a un microbio (por ejemplo, mediante ingestión, inhalación, contacto físico, etc.). En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una infección microbiana puede estar expuesto a un individuo que está infectado con el microbio. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una infección microbiana es aquel que está en una localización donde el microbio es prevalente (por ejemplo, alguien que está viajando a una localización donde el microbio es prevalente). En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno, y/o dolencia, desarrollará la enfermedad, trastorno, y/o dolencia. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno, y/o dolencia, no desarrollará la enfermedad, trastorno, y/o dolencia. En algunas realizaciones, el sujeto tiene, o es susceptible de tener cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad metabólica o degenerativa no autoinmunitaria, o una adicción. En algunas realizaciones, el sujeto tiene o es susceptible de tener una infección bacteriana, fúngica, por protozoos, parasítica o vírica. La causa de dicha infección puede ser cualquiera de los organismos que se proporcionan en el presente documento. En algunas realizaciones, el sujeto tiene o es susceptible de tener tuberculosis, malaria, leishmaniasis, *H. pylori*, una infección por *Staphylococcus* o una infección por *Salmonella*. En algunas realizaciones, el sujeto tiene o es susceptible de tener gripe. En algunas realizaciones, el sujeto tiene o es susceptible de tener una enfermedad autoinmunitaria, una alergia, o asma.

25 *Antígeno de linfocitos T:* Como se usa en el presente documento, el término "antígeno de linfocitos T" se refiere a cualquier antígeno que es reconocido y estimula una respuesta inmunitaria en un linfocito T (por ejemplo, un antígeno que es reconocido específicamente por un receptor de linfocitos T en un linfocito T mediante presentación del antígeno o una parte del mismo unido a una moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). En algunas realizaciones, un antígeno que es un antígeno de linfocitos T es también un antígeno de linfocitos B. En otras realizaciones, el antígeno de linfocitos T no es también un antígeno de linfocitos B. Los antígenos de linfocitos T son generalmente proteínas o péptidos. Los antígenos de linfocitos T pueden ser un antígeno que estimula una respuesta de linfocitos T CD8⁺, una respuesta de linfocitos T CD4⁺, o ambas. Los nanotransportadores, por lo tanto, en algunas realizaciones pueden estimular eficazmente ambos tipos de respuestas.

35 *Diana:* Como se usa en el presente documento, el término "diana" o "marcador" se refiere a cualquier entidad que es capaz de unirse específicamente a un resto de direccionamiento concreto. En algunas realizaciones, las dianas se asocian específicamente con uno o más tipos de tejidos concretos. En algunas realizaciones, las dianas se asocian específicamente con uno o más tipos de células concretos. Por ejemplo, un marcador específico de un tipo de célula se expresa a niveles al menos 2 veces mayores en este tipo de célula que en una población de células de referencia. En algunas realizaciones, el marcador específico del tipo de célula está presente a niveles al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, o al menos 1000 veces más que su expresión promedio en una población de referencia. La detección o medición de un marcador específico de un tipo de célula puede hacer posible distinguir el tipo o tipos de células de interés a partir de células de muchos, la mayoría, o todos los tipos diferentes. En algunas realizaciones, una diana puede comprender una proteína, un hidrato de carbono, un lípido, y/o un ácido nucleico, como se describe en el presente documento.

50 *Dirigida:* Una sustancia se considera que está "dirigida" para los fines que se describen en el presente documento si esta se une específicamente a una diana. En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento se une específicamente a una diana en condiciones restrictivas. Un nanotransportador inventivo, tal como un nanotransportador de vacunas, que comprende un resto de direccionamiento se considera que está "dirigido" si el resto de direccionamiento se une específicamente a una diana, administrar por tanto el nanotransportador completo a un órgano, tejido, célula, y/o local subcelular.

55 *Resto de direccionamiento:* Como se usa en el presente documento, el término "resto de direccionamiento" se refiere a cualquier resto que se une a un componente de una célula. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento se une específicamente a un componente de una célula. Dicho componente se denomina una "diana" o un "marcador". Un resto de direccionamiento puede ser un polipéptido, glucoproteína, un ácido nucleico, molécula pequeña, hidrato de carbono, lípido, etc. En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento es un anticuerpo o su porción característica. En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento es un receptor o su porción característica. En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento es un ligando o su porción característica. En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento es un resto de direccionamiento de ácido nucleico (por ejemplo, un aptámero) que se une a un marcador específico de un tipo de célula. En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento es una molécula pequeña, el resto de direccionamiento en algunas realizaciones está sobre la superficie del nanotransportador. En otras realizaciones, el resto de direccionamiento está encapsulado en interior

del nanotransportador. En otras realizaciones adicionales, el resto de direccionamiento está asociado con el nanotransportador. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento está asociado covalentemente con el nanotransportador. En otras realizaciones, el resto de direccionamiento no está asociado covalentemente con el nanotransportador. En otras realizaciones más, el resto de direccionamiento se une a un receptor expresado sobre la superficie de una célula. El resto de direccionamiento, en algunas realizaciones, se une a un receptor soluble. En algunas realizaciones, el receptor soluble es una proteína del complemento o un anticuerpo preexistente. En realizaciones adicionales, el resto de direccionamiento es para la administración del nanotransportador a las células presentadoras de antígeno, linfocitos T o linfocitos B. En algunas realizaciones, las células presentadoras de antígeno son macrófagos. En otras realizaciones, los macrófagos son macrófagos del seno subcapsular. En otras realizaciones adicionales, las células presentadoras de antígeno son células dendríticas. En algunas realizaciones, las células presentadoras de antígeno son células dendríticas foliculares. Los ejemplos específicos no limitantes de restos de direccionamiento incluyen moléculas que se unen a CD11b, CD169, receptor de manosa, DEC-205, CD11c, CD21/CD35, CX3CR1, o un receptor de Fc. En algunas realizaciones, la molécula que une cualquiera de los anteriores es un anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra CD169). En algunas realizaciones, la molécula que se une a un receptor de Fc es aquella que comprende la porción de Fc de una inmunoglobulina (por ejemplo, IgG). En otras realizaciones, la porción Fc de una inmunoglobulina es una porción Fc humana. En algunas realizaciones, la molécula que se une a CX3CR1 es CX3CL1 (fractalkina). Los restos de direccionamiento que se unen a CD169 incluyen anticuerpos dirigidos contra CD169 y ligandos de CD169, por ejemplo, CD227sialilado, CD43, CD206, o porciones de estos ligandos que retienen la función de unión, por ejemplo, porciones solubles.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un agente terapéutico, profiláctico, y/o diagnóstico (por ejemplo, un nanotransportador de vacunas inventivo) que es suficiente, cuando se administra a un sujeto que padece o es susceptible a una enfermedad, trastorno, y/o dolencia, para tratar, aliviar, mejorar mitigar, aliviar los síntomas, prevenir, retrasar el inicio de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de, y/o reducir la incidencia de la enfermedad, trastorno, y/o dolencia. Se pretende también que el término se refiera a una cantidad de nanotransportador o de su composición proporcionada en el presente documento que modula una respuesta inmunitaria en un sujeto.

Agente terapéutico: Como se usa en el presente documento, el término "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que, cuando se administra a un sujeto, tiene un efecto terapéutico, profiláctico, y/o diagnóstico y/o estimula un efecto biológico y/o farmacológico deseado,

Tratar: Como se usa en el presente documento, el término "tratar" se refiere a aliviar parcial o completamente, mejorar, mitigar, retrasar el inicio de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de, y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno, y/o dolencia. Por ejemplo, "tratar" una infección microbiana puede referirse a inhibir la supervivencia, el crecimiento, y/o la diseminación del microbio. El tratamiento puede administrarse a un sujeto que no presenta signos de la enfermedad, trastorno, y/o dolencia y /o a un sujeto que presenta solo signos tempranos de la enfermedad, trastorno, y/o dolencia con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar la patología asociada con la enfermedad, trastorno, y/o dolencia. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende la administración de un nanotransportador de vacunas inventivo a un sujeto.

Antígeno de linfocitos T universal: Como se usa en el presente documento, el término "antígeno de linfocitos T universal" se refiere a un antígeno de linfocitos T que puede promover que los linfocitos T ayuden y potencien una respuesta inmunitaria a un antígeno no relacionado completamente. Los antígenos de linfocitos t universales incluyen el toxoide del tétanos, así como uno o más péptidos derivados del toxoide del tétanos, el virus de Epstein-Barr, o el virus de la gripe. Los antígenos de linfocitos T universales pueden incluir también un componente del virus de la gripe, tal como hemaglutinina, neuraminidasa, o proteína nuclear, o uno o más péptidos derivados de los anteriores.

Nanotransportador de vacunas: Como se usa en el presente documento, el término "nanotransportador de vacunas" se refiere a una entidad que comprende al menos un agente inmunomodulador o un agente inmunoestimulador. En determinadas realizaciones, un nanotransportador de vacunas incluye al menos dos tipos de agentes inmunomoduladores. En algunas realizaciones, los agentes inmunomoduladores son antígenos, y el nanotransportador de vacunas comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más antígenos. Los diferentes antígenos pueden ser o derivarse de moléculas antigénicas completamente diferentes, o los diferentes antígenos pueden ser epítopos diferentes de la misma molécula antigénica. En otras realizaciones, el nanotransportador de vacunas comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más epítopos diferentes procedentes de la misma molécula antigénica. Un nanotransportador de vacunas, en algunas realizaciones, es capaz de estimular una respuesta inmunitaria en los linfocitos T y/o los linfocitos B. En otras realizaciones, el nanotransportador de vacunas es capaz de potenciar, dirigir, o redirigir una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, se puede usar cualquier ensayo disponible en la técnica para determinar si se han estimulado los linfocitos T y/o los linfocitos B. En algunas realizaciones, puede evaluarse la estimulación de los linfocitos T vigilando la producción de citoquinas inducida por antígenos, la proliferación de linfocitos T inducida por antígenos, y/o los cambios inducidos por antígenos en la expresión de proteínas. En algunas realizaciones, puede evaluarse la estimulación de linfocitos B vigilando los títulos de anticuerpos, las afinidades de

los anticuerpos, el comportamiento de los anticuerpos en ensayos de neutralización, recombinación por intercambio de clase, maduración por afinidad o anticuerpos específicos de antígenos, desarrollo de linfocitos B con memoria, desarrollo de células plasmáticas de vida prolongada que pueden producir grandes cantidades de anticuerpos de elevada afinidad durante periodos alargados de tiempo, reacciones de centros germinales, y/o comportamiento de anticuerpos en ensayos de neutralización. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende además al menos un resto de direccionamiento que puede ayudar a liberar el nanotransportador de vacunas a una diana concreta (por ejemplo, órgano, tejido, célula, y/o local subcelular) en un sujeto. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende además un agente inmunoestimulador que puede ayudar a estimular una respuesta inmunitaria en linfocitos T y/o linfocitos B. En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas comprenden lípidos, compuestos anfifílicos, polímeros, azúcares, matrices poliméricas, y/o partículas no poliméricas.

Polímero no adhesivo soluble en agua: Como se usa en el presente documento, el término "polímero no adhesivo soluble en agua, se refiere a un polímero que es soluble en agua y que puede conferir propiedades de bioensuciamiento reducidas. Los polímeros no adhesivos solubles en agua incluyen polietilenglicol, óxido de polietileno, polialquilenglicol, y óxido de polialquilenol.

Descripción detallada de determinadas realizaciones preferidas de la invención

Vacunas

Las vacunaciones son normalmente de tipo tanto pasivo como activo. En general, las vacunaciones activas implican la exposición del sistema inmunitario del sujeto a uno o más agentes que son reconocidos como no queridos, indeseados, y/o extraños y estimulan una respuesta inmunitaria endógena que da como resultado la activación de linfocitos que no han recibido tratamiento anteriormente específicos de antígenos que dan lugar a continuación a un aumento de linfocitos B secretores de anticuerpos o linfocitos T efectores específicos de antígenos y linfocitos T con memoria o ambos. Esta solución puede dar como resultado inmunidad protectora para toda la vida que se puede reforzar de tiempo en tiempo mediante la exposición renovada al mismo material antigénico. La perspectiva de la longevidad de una respuesta inmunitaria satisfactoria para activar la vacunación hace esta estrategia más deseable en la mayoría de escenarios clínicos que la vacunación pasiva por lo cual se inyecta un receptor con anticuerpos preformados o con linfocitos efectores específicos de antígenos, que pueden conferir una rápida protección ad hoc, pero normalmente no establecen una inmunidad persistente.

Una gran variedad de formulaciones de vacunas se están empleando o han sido empleadas en seres humanos. La ruta de administración más común en seres humanos mediante inyección intramuscular (i.m.), pero las vacunas pueden aplicarse también por vía oral, intranasal, subcutánea, por medio de inhalación, o por vía intravenosa. En la mayor parte de casos, los antígenos derivados de vacunas se presentan inicialmente a linfocitos no expuestos anteriormente a tratamiento en los ganglios linfáticos regionales.

Algunas vacunas corrientes contra, por ejemplo, patógenos microbianos, consisten en cepas de variantes atenuadas vivas o cepas de variantes no virulentas de microorganismos, u organismos muertos o inactivados de otra forma. otras vacunas utilizan componentes más o menos purificados de lisados de patógenos, tales como hidratos de carbono superficiales o proteínas recombinantes derivadas de patógenos que se fusionan algunas veces con otras moléculas, particularmente proteínas que pueden conferir actividad adyuvante.

Las vacunas utilizadas para inyecciones intramusculares se administran normalmente mediante un transportador adyuvante, más frecuentemente alumbre (es decir, sulfato de aluminio potasio), que se piensa que establece un depósito para la liberación prolongada de material antigénico, pero que ejerce también actividades inmunomoduladoras, tales como desviar hacia Th2 las respuestas mediante mecanismos que se entienden de forma incompleta (Lindblad, 2004, Immunol. Cell. Biol., 82:497; y Jordan et al., 2004, Science, 304:1808).

Las vacunas que utilizan patógenos vivos atenuados o inactivados dan como resultado normalmente una respuesta inmunitaria intensa, pero su uso tiene limitaciones. Por ejemplo, las cepas vivas de la vacuna pueden producir algunas veces patologías infecciosas, especialmente cuando se administran a receptores inmunocomprometidos. Además, muchos patógenos, particularmente virus, experimentan mutaciones rápidas continuas en su genoma, que les permiten escapar a las respuestas inmunitarias de cepas de vacunas antigénicamente distintas. Sin embargo, se piensa que la mayoría o todos los patógenos poseen determinados determinantes antigénicos que no mutan fácilmente debido a que se asocian con funciones esenciales. Los anticuerpos dirigidos contra estos epítomos conservados, más bien que los epítomos no esenciales más variables, pueden proteger contra virus muy mutables (Baba et al., 2000, Nat. Med., 6:200). Las vacunas basadas en patógenos intactos vivos o muertos no promueven necesariamente el reconocimiento de estos epítomos críticos, pero puede "distraer" esencialmente el sistema inmunitario para centrar su asalto sobre determinantes muy variables. De este modo, la presente invención abarca el reconocimiento de que un nanotransportador de vacunas diseñado mediante ingeniería genética que imita la naturaleza particulada muy inmunógena de las partículas víricas, pero presenta epítomos inmutables selectivamente esenciales, podría dar como resultado un anticuerpo neutralizante mucho más potente y "a prueba de fugas" y respuestas de linfocitos T efectores en microorganismos intactos.

Los mecanismos precisos por los cuales las vacunas estimulan respuestas de anticuerpos en los ganglios linfáticos drenantes (o no consiguen hacerlo) se entiende todavía de forma incompleta. Los linfocitos B y T son secuestrados inicialmente en distintas regiones anatómicas, los folículos B, localizados superficialmente y la paracorteza que los rodea y la corteza profunda, respectivamente. Tras la estimulación del antígeno, los linfocitos B específicos de antígenos en los folículos así como en los linfocitos T CD4 llegan activados al área de los linfocitos T y a continuación migran hacia la zona del borde entre los dos compartimentos. Los linfocitos B que han fagocitado los antígenos que se transmiten a través de la linfa, procesan el material adquirido y comienzan a presentar péptidos antigénicos en las moléculas superficiales MHC de clase II que son reconocidas a continuación por los linfocitos T CD4 activados (los linfocitos_{TFH}). El reconocimiento de antígenos permite a los _{TFH} para proporcionar ayuda a los linfocitos B, que constituye una potente señal de supervivencia y estimula la formación de centros germinales (GC) en los folículos B. La reacción de GC promueve la recombinación de cambio de clase, la maduración por afinidad de anticuerpos específicos de antígenos, y la formación de linfocitos B con memoria y de células plasmáticas de vida prolongada que pueden producir grandes cantidades de anticuerpos de elevada afinidad durante periodos prolongados de tiempo. De este modo, la presente invención abarca el reconocimiento de que un nanotransportador de vacunas puede tener componentes que permitan que el material antigénico sea reconocido eficazmente por los linfocitos B y los linfocitos T e induzca reacciones de GC vigorosas (Figura 1).

La presente invención describe sistemas para desarrollar nanotransportadores de vacunas para la administración de vacunas que puedan superar estas limitaciones anteriormente mencionadas de la tecnología de vacunas actual. La presente invención abarca el reconocimiento de que las partículas víricas transmitidas a través de los ganglios linfáticos que miden decenas a cientos de nanómetros de diámetro y que inducen potentes respuestas celulares y de anticuerpos se capturan y retienen sobre la superficie de macrófagos en el seno subcapsular de los ganglios linfáticos drenantes nodes (es decir, macrófagos del seno subcapsular, abreviados SCS-Mph). Estos macrófagos están implicados en la presentación temprana eficaz de partículas víricas intactas a los linfocitos B foliculares. En algunas realizaciones, los nanotransportadores inventivos imitan las partículas víricas y se dirigen a SCS-Mph. Como se muestra en el Ejemplo 1, tras la inyección subcutánea de nanopartículas (50 nm - 150 nm) de poli(ácido láctico-coalicólico) (PLGA) encapsuladas en Cy5 que se estabilizan en superficie con una monocapa de lípido y polietilenglicol, las nanopartículas inyectadas penetran fácilmente en los ganglios linfáticos y se unen en el seno subcapsular de los ganglios linfáticos drenantes de forma similar a los virus que se transmiten a través de la linfa. Los transportadores similares que transportan agente(s) inmunomoduladores que estimulan los linfocitos B y/o los linfocitos t son particularmente útiles en la vacunación de un sujeto.

De este modo, la presente invención abarca el reconocimiento de que los nanotransportadores, tales como los nanotransportadores con dimensiones de virus que se transmiten a través de la linfa, transportan un agente inmunomodulador que puede ser reconocido en los ganglios linfáticos como si fueran virus y puede estimular una potente respuesta inmunitaria, por ejemplo, cuando las partículas incluyen agentes) inmunomoduladores que son reconocidos por los linfocitos B y/o los linfocitos T.

Mediante el transporte de los agentes inmunomoduladores sobre la superficie y/o la carga de forma similar o distinta de agentes inmunomoduladores en el interior, los nanotransportadores puede liberar simultáneamente estos agentes inmunomoduladores a células distintas del sistema inmunitario y estimularlos. los agentes inmunomoduladores presentados sobre las superficies de nanotransportadores estimulan los linfocitos B, y los agentes inmunomoduladores encapsulados en los nanotransportadores se procesan mediante células presentadoras de antígenos (APC), tales como células dendríticas (DC), en tejidos linfoides /y por linfocitos B tras la activación) y se presentan a los linfocitos T. En algunas realizaciones, modificando la superficie de los nanotransportadores con un resto de direccionamiento (por ejemplo, un anticuerpo o uno de sus fragmentos, un péptido o un polipéptido, Affibody®, Nanobody™, AdNectin™, Avimer™, aptámero, Spiegelmer®, molécula pequeña, lípido, hidrato de carbono, etc.), los nanotransportadores pueden liberar agentes inmunomoduladores a células presentadoras de antígeno específicas, tales como DC, SCS-Mph, FDC, linfocitos T, linfocitos B, y/o sus combinaciones. Los nanotransportadores de vacunas se describen en detalle adicional en la sección titulada “*Nanotransportadores de vacunas.*”

Linfocitos T

La presente invención proporciona nanotransportadores de vacunas para la administración de, por ejemplo, agentes inmunomoduladores a las células del sistema inmunitario. En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas comprenden al menos un agente inmunomodulador que se puede administrar a las APC, que a continuación procesan y administran el(los) agente(s) inmunomodulador(es) a los linfocitos T.

Las APC profesionales son muy eficaces en la internalización del antígeno, ya sea mediante fagocitosis como mediante endocitosis, y a continuación expresan un fragmento del antígeno, unida tanto a una molécula del complejo de histocompatibilidad mayor de clase II MHC de clase II) como a una molécula MHC de clase I sobre la membrana de la APC. los linfocitos T CD4 reconocen e interactúan con el complejo de la molécula de MHC de clase II-antígeno sobre la membrana de la APC, mientras que los linfocitos T CD8 reconocen e interactúan con el complejo de la molécula de MHC de clase I-antígeno. A continuación se producen señales coestimuladoras adicionales así como la modulación de las citoquinas por las APC, conduciendo a la activación de los linfocitos T.

Agentes inmunomoduladores

La presente invención proporciona nanotransportadores de vacunas que comprende uno o más agentes inmunomoduladores. En algunas realizaciones, los nanotransportadores inventivos que comprenden uno o más agentes inmunomoduladores se usan como vacunas. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador puede comprender proteínas o péptidos aislados y/o recombinantes, hidratos de carbono, glucoproteínas, glucopéptidos, proteoglicanos, organismos y virus inactivados, organismos y virus muertos, organismos o virus genéticamente alterados, y extractos celulares. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador puede comprender ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, y/o moléculas pequeñas. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador es aquel que estimula una respuesta inmunitaria. En otras realizaciones, un agente inmunomodulador es un polinucleótido que codifica una proteína o péptido que cuando se expresa la proteína o péptido se estimula una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador es un antígeno. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador es una proteína o péptido. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador se usa para vacunas.

En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador es cualquier proteína y/u otro antígeno derivado de un patógeno. El patógeno puede ser un virus, bacteria, hongo, por protozoos, parásito, etc. En algunas realizaciones, los agentes inmunomoduladores pueden incluir antígenos de organismos bacterianos tales como especies de *Borrelia*, *Bacillus anthracis*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella pertussis*, *Camphylobacter jejuni*, especies de *Chlamydia*, *Chlamydial psittaci*, *Chlamydial trachomatis*, especies de *Clostridium*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium diphtheria*, especies de *Coxiella*, una especie de *Enterococcus*, especies de *Erichia*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, especies de *Haemophilus*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, especies de *Lactobacillus*, especies de *Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Leptospirosis interrogans*, especies de *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, especies de *Mycobacterium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, especies de *Mycoplasma*, *Mycoplasma pneumoniae*, especies de *Neisseria*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, especies de *Pneumococcus*, especies de *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa*, especies de *Salmonella*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enterica*, especies de *Rickettsia*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, especies de *Shigella*, especies de *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus*, especies de *Streptococcus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyrogenes*, *Streptococcus mutans*, especies de *Treponema*, *Treponema pallidum*, especies de *Vibrio*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, y similares.

En algunas realizaciones, los agentes inmunomoduladores pueden incluir antígenos de organismos víricos tales como los virus de la viruela, virus de la viruela (variola), virus del Ébola, hepadnavirus, virus de Marburg, el virus del dengue, virus de la gripe A y de la gripe B, virus paragripal, virus respiratorio sincitial, sarampión (virus de la rubéola), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma humano (VPH), varicela-zóster, herpes simple 1 y 2, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, JC virus, rabdovirus, rotavirus, rinovirus, adenovirus, ortomixovirus, virus del papiloma, parvovirus, picornavirus, poliovirus, paperas, rabia, reovirus, rubeola, togavirus, retrovirus, virus coxsackie, encefalitis equina, encefalitis japonesa, fiebre amarilla, fiebre del valle del Rift, hepatitis A, B, C, D, y E, y similares. Los organismos víricos incluyen aquellos que son virus de ADNds, virus de ADNss, virus de ARNds, (+)virus de ARNss (-) virus de ARNs, virus de ARNss-RT y virus de ADNds-RT.

En algunas realizaciones, los agentes inmunomoduladores pueden incluir antígenos de organismos fúngicos, protozoarios, y/o parasíticos tales como especies de *Aspergillus*, especies de *Candida*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, especies de *Cryptococcus*, *Cryptococcus neoformans*, *Entamoeba histolytica*, *Histoplasma capsulatum*, especies de *Leishmania*, *Nocardia asteroides*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis*, especies de *Toxoplasma*, *Trypanosoma brucei*, *Schistosoma mansoni*, y similares.

En algunas realizaciones, los agentes inmunomoduladores pueden incluir proteínas E1 y/o E2 de VHC. En algunas realizaciones, los agentes inmunomoduladores pueden incluir gp120 de VIH. En algunas realizaciones, los agentes inmunomoduladores pueden incluir hemaglutinina y/o neuraminidasa del virus de la gripe. En algunas realizaciones, los agentes inmunomoduladores pueden incluir polisacáridos pneumocócicos o la familia 1 y/o la familia 2 de PspA de *Streptococcus pneumoniae* o los polisacáridos capsulares de los tipos 5 y 8 de los componentes de la superficie microbiana que reconocen la molécula de la matriz adhesiva de *Staphylococcus aureus*. En algunas realizaciones, los agentes inmunomoduladores pueden incluir el manano de *Candida albicans* o el polisacárido capsular criptocócico de *Cryptococcus neoformans*. En algunas realizaciones, los agentes inmunomoduladores pueden incluir PfEMPI de *Plasmodium falciparum* u otros antígenos derivados de parásitos expresados en glóbulos rojos infectados con plasmodium o GRA7 de *Toxoplasma gondii*.

Cualquiera de los antígenos descritos en el presente documento puede estar en la forma de organismos completos muertos, péptidos, proteínas, glucoproteínas, glucopéptidos, proteoglicanos, ácidos nucleicos que codifican una proteína o péptido, hidratos de carbono, moléculas pequeñas, o sus combinaciones.

En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador se deriva de un microorganismo para el cual existe ya al menos una vacuna. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador se deriva de un microorganismo para el cual no se han desarrollado vacunas.

En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende al menos un tipo de agente inmunomodulador. En algunas realizaciones, todos los agentes inmunomoduladores de un nanotransportador de vacuna son idénticos entre sí. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende un número de diferentes agentes inmunomoduladores. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende múltiples agentes inmunomoduladores individuales, todos los cuales son el mismo. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende exactamente un tipo de agente inmunomodulador. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende exactamente dos tipos distintos de agentes inmunomoduladores. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende más de dos tipos distintos de agentes inmunomoduladores. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más tipos distintos de agentes inmunomoduladores.

En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende dos tipos de agentes inmunomoduladores que se derivan de un único género de microorganismo. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende dos tipos de agentes inmunomoduladores que se derivan de un único género y especie de microorganismo. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende dos tipos de agentes inmunomoduladores que se derivan de un único género, especie y cepa de microorganismo. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende dos tipos de agentes inmunomoduladores que se derivan de un único clon de microorganismos.

En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende más de dos tipos de agentes inmunomoduladores que se derivan de un único género de microorganismos. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende más de dos tipos de agentes inmunomoduladores que se derivan de un único género y especie de microorganismos. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende más de dos tipos de agentes inmunomoduladores que se derivan de un único género, especie y cepa de microorganismo. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende más de dos tipos de agentes inmunomoduladores que se derivan de un único clon de un microorganismo.

En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende dos o más tipos de agentes inmunomoduladores que se derivan de un único género de microorganismo. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende dos o más tipos de agentes inmunomoduladores que se derivan de un único género y especie de microorganismos. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende dos o más tipos de agentes inmunomoduladores que se derivan de un único género, especie y cepa de microorganismo.

En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende dos o más tipos de agentes inmunomoduladores que se derivan de diferentes cepas de una única especie de microorganismos. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende dos o más tipos de agentes inmunomoduladores que se derivan de diferentes especies del mismo género de microorganismos. En otras realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende dos o más tipos de agentes inmunomoduladores derivados cada uno de diferentes géneros de microorganismos.

En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende un único tipo de agente inmunomodulador que estimula una respuesta inmunitaria en linfocitos B y linfocitos T. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende dos tipos de agentes inmunomoduladores, en el que el primer agente inmunomodulador estimula los linfocitos B, y el segundo tipo de agente inmunomodulador estimula los linfocitos T. En determinadas realizaciones, uno o ambos agentes pueden estimular linfocitos T y linfocitos B. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende más de dos tipos distintos de agentes inmunomoduladores, en el que uno o más tipos de agentes inmunomoduladores estimulan los linfocitos B, y uno o más tipos de agentes inmunomoduladores estimulan los linfocitos T.

En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende al menos un tipo de agente inmunomodulador que está asociado con la superficie exterior del nanotransportador de vacunas. En algunas realizaciones, la asociación es covalente. En algunas realizaciones, la asociación covalente está mediada por uno o más enlazadores. En algunas realizaciones, la asociación es no covalente. En algunas realizaciones, la asociación no covalente está mediada por interacciones de carga, interacciones de afinidad, coordinación metálica, adsorción física, interacciones hospedador-huésped, interacciones hidrófobas, interacciones de apilado de TT, interacciones de enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo, y/o sus combinaciones. Para una descripción más detallada de cómo un agente inmunomodulador puede estar asociado con un nanotransportador de vacunas, véase la siguiente sección titulada *“Producción de nanotransportadores de vacunas.”*

En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas incluye una membrana lipídica (por ejemplo, una bicapa lipídica, una monocapa lipídica, etc.). Al menos un agente inmunomodulador puede estar asociado con la membrana lipídica. En algunas realizaciones, al menos un agente inmunomodulador está incluido en la membrana lipídica. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende al menos un agente

inmunomodulador que está asociado con la superficie interior de la membrana lipídica. En algunas realizaciones, al menos un agente inmunomodulador está encapsulado en la membrana lipídica de un nanotransportador de vacunas. En algunas realizaciones, al menos un tipo de agente inmunomodulador puede estar localizado en múltiples localizaciones de un nanotransportador de vacunas. Por ejemplo, un primer tipo de agente inmunomodulador puede estar incluido en una membrana lipídica, y un segundo tipo de agente inmunomodulador puede estar encapsulado en una membrana lipídica de un nanotransportador de vacunas. Para dar otro ejemplo, un primer tipo de agente inmunomodulador puede estar asociado con la superficie exterior de una membrana lipídica, y un segundo tipo de agente inmunomodulador puede estar asociado con la superficie interior de la membrana lipídica de un nanotransportador de vacunas. En algunas realizaciones, un primer tipo de agente inmunomodulador puede estar incluido en la luz de una bicapa lipídica de un nanotransportador de vacunas, y la bicapa lipídica puede encapsular una matriz polimérica a través de la cual se distribuye un segundo tipo de agente inmunomodulador. En algunas realizaciones, un primer tipo de agente inmunomodulador y un segundo tipo de agente inmunomodulador puede estar en el mismo local de un nanotransportador de vacunas (por ejemplo, ambos pueden estar asociados a la superficie exterior de un nanotransportador de vacunas; ambos pueden encapsularse en el interior del nanotransportador de vacunas; *etc.*).

El nanotransportador de vacunas incluye un polímero (por ejemplo, un núcleo polimérico). Al menos un tipo de agente inmunomodulador puede estar asociado con el polímero. En algunas realizaciones, al menos un tipo de agente inmunomodulador está incluido en el polímero. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende al menos un tipo de agente inmunomodulador que está asociado con la superficie interior del polímero. En algunas realizaciones, al menos un tipo de agente inmunomodulador está encapsulado con el polímero de un nanotransportador de vacunas. En algunas realizaciones, al menos un tipo de agente inmunomodulador puede estar localizado en múltiples localizaciones de un nanotransportador de vacunas. Por ejemplo, un primer tipo de agente inmunomodulador puede estar incluido en un polímero, y un segundo tipo de agente inmunomodulador puede estar encapsulado en una membrana lipídica que rodea el núcleo polimérico de un nanotransportador de vacunas. Para dar otro ejemplo, un primer tipo de agente inmunomodulador puede estar asociado con la superficie exterior de un polímero, y un segundo tipo de agente inmunomodulador puede estar incluido en el polímero de un nanotransportador de vacunas.

Una persona normalmente experta en la materia reconocerá que los ejemplos precedentes son solo representativos de las muchas maneras diferentes en las que múltiples agentes inmunomoduladores pueden estar asociados con diferentes locales de nanotransportadores de vacunas. Múltiples agentes inmunomoduladores pueden estar localizados en cualquier combinación de locales de nanotransportadores de vacunas. Además, los ejemplos anteriormente mencionados pueden aplicarse también a los otros agentes de un nanotransportador (por ejemplo, un agente inmunoestimulador).

En algunas realizaciones, el agente inmunomodulador es un antígeno de linfocitos T, y el antígeno de linfocitos T se deriva del mismo patógeno contra el cual se pretende la vacunación. En este caso, un número de linfocitos T inicialmente pequeño no expuestos anteriormente a tratamiento se estimulan para generar linfocitos T efectores específicos de patógenos y linfocitos T con memoria. En algunas realizaciones, el antígeno puede tomarse de una fuente no relacionada, tal como un agente infeccioso para el cual existe ya una inmunidad ampliamente diseminada (por ejemplo, el toxoide del tétanos o un componente común del virus de la gripe, tal como hemaglutinina, neuraminidasa, o proteína nuclear). En el último caso, las vacunas explican la presencia de linfocitos T con memoria que han surgido en respuesta a infecciones o vacunaciones previas. Las células con memoria reaccionan en general más rápida y vigorosamente a una reestimulación y, por lo tanto, pueden proporcionar una fuente superior de ayuda a los linfocitos B.

Otros antígenos de linfocitos T incluyen, pero sin limitación, antígenos de enfermedades degenerativas, antígenos de enfermedades infecciosas, antígenos cancerosos, alérgenos, aloantígenos, antígenos de enfermedades atópicas, antígenos de enfermedades autoinmunitarias, sensibilizadores de contacto, haptenos, xenoantígenos, o enzimas de enfermedades metabólicas o sus productos enzimáticos. En algunas realizaciones, el antígeno de enfermedad infecciosa es un antígeno vírico, que incluye cualquier antígeno derivado de cualquiera de los virus descritos en el presente documento. Los ejemplos de antígenos de linfocitos T incluyen aquellos proporcionados en otra parte en el presente documento.

En algunas realizaciones, los antígenos de linfocitos T se incorporan en nanotransportadores como proteínas intactas. En algunas realizaciones, los antígenos de linfocitos T se incorporan en nanotransportadores como proteínas modificadas. En algunas realizaciones, los antígenos de linfocitos T se incorporan en nanotransportadores como proteínas mutadas. En algunas realizaciones, los antígenos de linfocitos T se proporcionan como una colección de péptidos solapantes, que pueden reforzar la incorporación del antígeno en los complejos MHC de clase II y, por lo tanto, estimulan además una respuesta auxiliar. En algunas realizaciones, los antígenos de linfocitos T se proporcionan como una colección de péptidos no solapantes, que pueden reforzar la incorporación del antígeno en los complejos MHC de clase II y, por lo tanto, estimulan además una respuesta auxiliar. En algunas realizaciones, los antígenos de linfocitos T se proporcionan como ácidos nucleicos que codifican los antígenos.

En algunas realizaciones, los nanotransportadores inventivos, tales como los nanotransportadores de vacunas,

comprenden menos de 90 % en peso, menos de 75 % en peso, menos de 50 % en peso, menos de 40 % en peso, menos de 30 % en peso, menos de 20 % en peso, menos de 15 % en peso, menos de 10 % en peso, menos de 5 % en peso, menos de 1 % en peso o menos de 0,5 % en peso del agente inmunomodulador.

5 Restos de direccionamiento

En algunas realizaciones, los nanotransportadores inventivos comprende uno o más restos de direccionamiento. En determinadas realizaciones de la invención, los transportadores están asociados con uno o más restos de direccionamiento. Un resto de direccionamiento es cualquier resto que se une a un componente asociado con un órgano, tejido, célula, matriz extracelular, y/o local subcelular. En algunas realizaciones, dicho componente se denomina una "diana" o un "marcador". y estos se describen con más detalle a continuación.

Un resto de direccionamiento puede ser un ácido nucleico, polipéptido, glucoproteína, hidrato de carbono, lípido, molécula pequeña, etc. Por ejemplo, un resto de direccionamiento puede ser un resto de direccionamiento de ácido nucleico (por ejemplo, un aptámero, Spiegelmer®, etc.) que se une a un marcador específico del tipo de célula. En general, un aptámero es un oligonucleótido (por ejemplo, ADN, ARN, o uno de sus análogos o derivados) que se une a una diana concreta, tal como un polipéptido. En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento puede ser un ligando natural o sintético de un receptor de la superficial celular, por ejemplo, un factor de crecimiento, hormona, LDL, transferrina, etc. Un resto de direccionamiento puede ser un anticuerpo, término que se pretende que incluya fragmentos de anticuerpos, porciones características de anticuerpos, anticuerpos monocatenarios, etc. Se pueden usar proteínas de unión sintéticas tales como Affibodies®, Nanobodies™, AdNectins™, Avimers™, etc. Los restos de direccionamiento de péptidos se pueden identificar, por ejemplo, utilizando procedimientos tales como la expresión en fagos. Esta técnica se ha usado ampliamente para identificar ligandos específicos de células para varios tipos diferentes de células.

De acuerdo con la presente invención, un resto de direccionamiento reconoce una o más "dianas" o "marcadores" asociados con un órgano, tejido, célula, y/o local subcelular. En algunas realizaciones, una diana puede ser un marcador que se asocia de manera exclusiva o principal a uno o a unos pocos tipos de células, con una o unas pocas enfermedades y con una o unas pocas etapas de desarrollo. Un marcador específico de un tipo de célula se expresa normalmente a niveles al menos 2 veces mayores en este tipo de célula que en una población de células de referencia que puede consistir, por ejemplo, de una mezcla que contiene una cantidad aproximadamente igual de células (por ejemplo, números aproximadamente iguales de células, volúmenes aproximadamente iguales de células, masas aproximadamente iguales de células, etc.). En algunas realizaciones, el marcador específico del tipo de célula está presente a niveles al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, al menos 1000 veces, al menos 5000 veces, o al menos 10.000 veces más que su expresión promedio en una población de referencia. La detección o medición de un marcador específico de un tipo de célula puede hacer posible distinguir el tipo o tipos de células de interés a partir de células de muchos, la mayoría, o todos los tipos diferentes.

En algunas realizaciones, una diana puede comprender una proteína, un hidrato de carbono, un lípido, y/o un ácido nucleico. En determinadas realizaciones, una diana puede comprender una proteína y/o una de sus porciones características, tal como un marcador tumoral, integrina, receptor superficial celular, proteína transmembrana, proteína intercelular, canal de iones, proteína transportadora de membrana, una enzima, anticuerpo, proteína química, glucoproteína, etc. En determinadas realizaciones, una diana puede comprender un hidrato de carbono y/o una de sus porciones características, tal como una glucoproteína, azúcar (por ejemplo, monosacárido, disacárido, polisacárido), glicocalix (es decir, la zona periférica rica en hidratos de carbono sobre la superficie exterior de las células más eucariotas) etc. En determinadas realizaciones, una diana puede comprender un lípido y/o sus porciones características, tales como un aceite, ácido graso, glicérido, hormona, esteroide (por ejemplo, colesterol, ácido biliar), vitamina (por ejemplo, vitamina E), fosfolípido, esfingolípido, lipoproteína, etc. En determinadas realizaciones, una diana puede comprender un ácido nucleico y/o sus porciones características, tal como un ácido nucleico de ADN; un ácido nucleico de ARN; un ácido nucleico de ADN modificado; un ácido nucleico de ARN modificado; el ácido nucleico incluye cualquier combinación de ADN, ARN, ADN modificado y ARN modificado; etc.

En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento sería la molécula de glucoproteína superficial de VSV. VSV comprende una única molécula superficial, VSV-G, que es un agonista receptor de tipo toll. VSV se dirige eficazmente a las células del sistema inmunitario, de esta forma, en algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas podrían comprender la molécula superficial de VSV a fin de dirigir los nanotransportadores de vacunas a las células del sistema inmunitario.

En algunas realizaciones, una diana es un marcador tumoral. En algunas realizaciones, un marcador tumoral es un antígeno que se expresa en células tumorales pero no en células sanas y/o normales. En algunas realizaciones, un marcador tumoral es un antígeno que es más prevalente en células tumorales que en células sanas y/o normales. Los marcadores tumorales ilustrativos incluyen, pero sin limitación, gp 100; Melan-A; tirosinasa; PSMA; HER-2/neu; MUC-1; topoisomerasa IIα; sialil-Tn; antígeno carcinoembrionario; proteína 1 de unión a ERβ-3; alfa-fetoproteína; y

los antígenos MAGE-A1 de testículos cancerosos, MAGE A4, y NY-ESO-1.

5 En algunas realizaciones, una diana es un marcador de APC. En algunas realizaciones, una diana APC es un antígeno que se expresa en APC pero no en no APC. En algunas realizaciones, una diana APC es un antígeno que es más prevalente en PC que en no APC. Los marcadores de APC ilustrativos incluyen, pero sin limitación, CD11c, CD11b, CD14, CD40, CD45, CD163, CD169 (sialoadhesina), DEC205 (CD205), MHC de clase II, DC-SIGN, CD21/CD35, y Fc γ RI, PD-L2. En algunas realizaciones, los marcadores de APC incluyen cualquiera de los marcadores de DC y/o macrófagos, los ejemplos de los cuales se describen en el presente documento.

10 En determinadas realizaciones, una diana es un marcador de DC. En algunas realizaciones, una diana de DC es un antígeno que se expresa en DC pero no en no DC. En algunas realizaciones, un antígeno DC es un antígeno que es más prevalente en DC que en no DC. Se relacionan a continuación los marcadores de DC ilustrativos en la sección titulada "Células dendríticas" e incluyen aquellos proporcionados en otra parte en el presente documento.

15 En determinadas realizaciones, una diana es un marcador de linfocitos T. En algunas realizaciones, una diana de linfocitos T es un antígeno que se expresa en linfocitos T pero no en linfocitos no T. En algunas realizaciones, una diana de linfocito T es un antígeno que es más prevalente en linfocitos T que en linfocitos no T. Los marcadores de linfocitos T ilustrativos se relacionan a continuación en la sección titulada "Restos de direccionamiento de linfocitos T" e incluyen los proporcionados en otras partes del presente documento.

20 En algunas realizaciones, una diana se expresa preferentemente en tipos de células concretos. Por ejemplo, la expresión de una APC, DC, y/o una diana de linfocitos T en APC, DC, y/o linfocitos T está al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces o al menos 1000 veces expresada en exceso en APC, DC, y/o linfocitos T con respecto a una población de referencia. En algunas realizaciones, una población de referencia no de APC, FDC, y/o linfocitos T.

30 En algunas realizaciones, la expresión de una APC, DC, y/o un linfocito T diana en APC, DC, y/o linfocitos T está al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces o al menos 1000 veces expresada en exceso en APC activadas, DC, y/o linfocitos T con respecto a una población de referencia. En algunas realizaciones, una población de referencia puede comprender APC, DC, y/o linfocitos T no activados.

35 En algunas realizaciones, los nanotransportadores inventivos, tales como los nanotransportadores de vacunas, comprenden menos de 50 % en peso, menos de 40 % en peso, menos de 30 % en peso, menos de 20 % en peso, menos de 15 % en peso, menos de 10 % en peso, menos de 5 % en peso, menos de 1 % en peso o menos de 0,5 % en peso del resto de direccionamiento.

40 En algunas realizaciones, los restos de direccionamiento se asocian covalentemente con un nanotransportador. En algunas realizaciones, la asociación covalente está mediada por un enlazador. En algunas realizaciones, los restos de direccionamiento no están asociados covalentemente con un nanotransportador. Por ejemplo, los restos de direccionamiento pueden estar asociados con la superficie de, encapsularse en el interior, rodearse por, y/o distribuirse en la totalidad de la matriz polimérica de una partícula inventiva. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un resto de direccionamiento puede estar encapsulado en, rodeado por, y/o disperso en la totalidad de la membrana liposómica y/o la matriz polimérica de un nanotransportador. De forma alternativa o adicional, un resto de direccionamiento puede estar asociado con un nanotransportador mediante interacciones de carga, interacciones de afinidad, coordinación metálica, adsorción física, interacciones hospedador-huésped, interacciones hidrófobas, interacciones de apilado de TT, interacciones de enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electroestáticas, interacciones dipolo-dipolo, y/o sus combinaciones. Se describen en detalle a continuación la asociación de restos de direccionamiento con nanotransportadores de vacunas, en la sección titulada "Producción de nanotransportadores de vacunas".

Células dendríticas

55 Las células dendríticas (DC) son un tipo de leucocitos mieloides; están entre las células presentadoras de antígeno más potentes para los linfocitos T. Las DC restantes residen en muchos tejidos, incluyendo los ganglios linfáticos, en un estado tolerogénico inmaduro, es decir, presentan niveles de intermedios a elevados de complejos de péptido-MHC, pero con pocas o ninguna moléculas coestimuladoras y sin citoquinas secretoras que los linfocitos T necesitan para diferenciarse en células efectoras. Los linfocitos T que se presentan sin un antígeno específico por las DC inmaduras comienzan a proliferar durante unos pocos días, pero mueren a continuación por mediante apoptosis o se convierten en insensibles a una activación adicional. El agotamiento subsiguiente de las respuestas de linfocitos T específicos de antígenos vuelven al hospedador selectivamente tolerante a este antígeno. Por el contrario, cuando las DC adquieren antígenos a la vez que se exponen a estímulos de maduración, las células regulan en exceso rápidamente el MHC y las moléculas coestimuladoras y secretan algunas citoquinas. Las DC maduras ahora son potentes inductores de linfocitos T efectoras y de la memoria inmunológica. La maduración de las DC puede estar inducida por muchas señales, tales como determinadas citoquinas inflamatorias, la ligadura de los CD40 expresados

en las DC, los agonistas de los TLR, *por ejemplo*, la endotoxina bacteriana), los complejos inmunitarios, el complemento activado, las células necróticas, las células apoptóticas, el urato libre, cristales de urato, y/o HMGB-1.

5 DEC-205 (es decir, CD205) es una lectina multifuncional expresada en superficie que se expresa selectivamente en las DC y las células epiteliales tímicas en tejidos linfoides. Los experimentos *in vivo* con anticuerpos monoclonales α -DEC-205 quiméricos inyectados por vía subcutánea han mostrado que la unión del ligando a DEC-205 induce la internalización eficaz y el procesamiento posterior del material introducido mediante endocitosis para la presentación en moléculas de MHC en ratones y seres humanos (Hawiger et al., 2001, J. Exp. Med. 194:769; Bonifaz et al., 2002, J. Exp. Med., 196:1627; y Bozzacco et al., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 104:1289). Tras la inyección intracutánea o subcutánea, el anticuerpo quimérico es transportado mediante los vasos linfáticos a los ganglios linfáticos drenantes donde se une específicamente a las DC residentes, proporcionando de esta manera los medios para dirigir antígenos a las DC restantes sin dar lugar a su maduración. Las DC dirigidas inducirán a continuación la tolerancia de los linfocitos T al antígeno presentado, más bien que la inmunidad. Sin embargo, cuando DEC-205 se dirige conjuntamente con un agente inmunoestimulador que induce la maduración de la DC (por ejemplo, α -CD40 o uno o más ligandos para las TLR expresadas en DC; descritos con más detalle en la sección titulada “Agentes inmunoestimuladores”), a continuación la vacuna actúa como un potente inmunoestimulante que promueve preferentemente las respuestas de los linfocitos T citotóxicos y de los linfocitos T efectores de tipo Th1.

20 El direccionamiento de DC se puede llevar a cabo mediante restos que se unen a DC-205, CD11c, MHC de clase II, CD80, CD86, DC-SIGN, CD11b, BDCA-1, BDCA-2, BDCA-4, Siglec-H, CX3CR1, y/o Langerina.

En algunas realizaciones, se puede llevar a cabo el direccionamiento de DC mediante cualquier resto director que se une específicamente a cualquier entidad entity (por ejemplo, proteína, lípido, hidrato de carbono, molécula pequeña, etc.) que se expresa prominentemente y/o está presente en las DC (es decir, un marcador de DC). Los marcadores de DC ilustrativos incluyen, pero sin limitación, CD1a (R4, T6, HTA-1); CD1b (R1); CD1c (M241, R7); CD1d (R3); CD1e (R2); CD11b (cadena de integrina α M, CR3, Mo1, C3niR, Mac-1); CD11c (Integrina α X, p150, 95, AXb2); CDw117 (Lactosil ceramida, LacCer); CD19 (B4); CD33. (gp67); CD 35 (CR1, receptor de C3b/C4b); CD 36 (GpIIIb, GPIV, PASIV); CD39 (ATP deshidrogenasa, NTPdeshidrogenasa-1); CD40 (Bp50); CD45 (LCA, T200, B220, Ly5); CD45RA; CD45RB; CD45RC; CD45RO (UCHL-1); CD49d (VLA-4 α , Integrina α 4); CD49e (VLA-5 α , Integrina α 5); CD58 (LFA-3); CD64 (FcyRI); CD72 (Ly-19.2, Ly-32.2, Lyb-2); CD73 (Ecto-5'nuclotidasa); CD74 (II, cadena invariante); CD80 (B7, B7-1, BB1); CD81 (TAPA-1); CD83 (HB15); CD85a (ILT5, LIR3, HL9); CD85d (ILT4, LIR2, MIR10); CD85j (ILT2, LIR1, MIR7); CD85k (ILT3, LIR5, HM18); CD86 (B7-2/B70); CD88 (C5aB); CD97 (BL-KDD/F12); CD101 (IGSF2, P126, V7); CD116 (GM-CSFR α); CD120a (TMFRI, p55); CD120b (TNFR2, p75, TNFR p80); CD123 (IL-3R α); CD139; CD148 (HPTP- η , p260, DEP-1); CD150 (SLAM, IPO-3); CD156b (TACE, ADAM17, cSVP); CD157 (Mo5, BST-1); CD167a (DDR1, trkE, cak); CD168 (RHAMM, IHABP, HMMR); CD169 (Sialoadhesina, Siglec-1); CD170 (Siglec-5); CD171 (L1CAM, NILE); CD172 (SIRP-1 α , MyD-1); CD172b (SIRP β); CD180 (RP105, Bgp95, Ly64); CD184 (CXCR4, NPY3R); CD193 (CCR3); CD196 (CCR6); CD197 (CCR7 (ws CDw197)); CDw197 (CCR7, EB1, BLR2); CD200 (OX2); CD205 (DEC-205); CD206 (MMR); CD207 (Langerina); CD208 (DC-LAMP); CD209 (DC-SIGN); CDw218a (IL18R α); CDw218b (IL8R β); CD227 (MUC1, PUM, PEM, EMA); CD230 (Proteína priónica (Prp)); CD252 (OX40L, superfamilia TNF (ligando), miembro 4); CD258 (LIGHT, superfamilia TNF (ligando), miembro 14); CD265 (TRANCE-R, superfamilia TNF-R, miembro 11a); CD271 (NGFR, p75, superfamilia TNFR, miembro 16); CD273 (B7DC, PDL2); CD274 (B7H1, PDL1); CD275 (B7H2, ICOSL); CD276 (B7H3); CD277 (BT3.1, familia B7; Butirofilina 3); CD283 (TLR3, receptor 3 de tipo TOLL); CD289 (TLR9, receptor 9 de tipo TOLL); CD295 (LEPR); CD298 (ATP1B3, subunidad β 3 de la Na K ATPasa); CD300a (CMRF-35H); CD300c (CMRF-35A); CD301 (MGL1, CLECSF14); CD302 (DCL1); CD303 (BDCA2); CD304 (BDCA4); CD312 (EMR2); CD317 (BST2); CD319 (CRACC, SLAMF7); CD320 (8D6); y CD68 (gp110, Macrosialina); MHC de clase II; BDCA-1; Siglec-H; en el que los nombres relacionados en paréntesis representan nombres alternativos.

Restos de direccionamiento de linfocitos T

50 En algunas realizaciones, El direccionamiento de linfocitos T puede llevarse a cabo mediante cualquier resto de direccionamiento que se une a cualquier entidad entity (por ejemplo, proteína, lípido, hidrato de carbono, molécula pequeña, etc.) que se expresa prominentemente y/o está presente en linfocitos T (es decir, un marcador de linfocitos T). Los marcadores de linfocitos T ilustrativos incluyen, pero sin limitación, CD2 (E- rosette R, T11, LFA-2); CD3 (T3); CD3 α ; CD3 β ; CD3 ϵ ; CD4 (L3T4, W3/25, T4); CD5 (T1, Tp67, Leu-1, LY-1); CD6 (T12); CD7 (gp40, Leu 9); CD8a (Leu2, T8, Lyt2,3); CD8b (CD8, Leu2, Lyt3); CD11a (LFA-1 α , una cadena de la integrina); CD11b (cadena de integrina α M, CR3, Mo1, C3niR, Mac-1); CD11c (Integrina α X, p150, 95, AXb2); CD15s (Sialil Lewis X); CD15u (3' sulfato Lewis X); CD15su (6 sulfato-sialil Lewis X); CD16b (Fc γ RIIb); CDw17 (Lactosil ceramida, LacCer); CD18 (Integrina β 2 CD11a, b, subunidad c β); CD26 (DPP IV ectoenzima, proteína de unión ADA); CD27 (T14, S152); CD28 (Tp44, T44); CD29 (GP11a plaquetaria, Integrina β -1, GP); CD31 (PECAM-1, Endocam); CD35 (CR1, receptor de C3b/C4b); CD37 (gp52-40); CD38 (ADP-ribosil/ciclasa, T10); CD43 (Sialoforina, Leucosialina); CD44 (ECM2, H-CAM, Pgp-1); CD45 (LCA, T200, B220, Ly5); CD45RA (p56lck, p59fyn, quinasas Src); CD45RB (p56lck, p59fyn, quinasas Src); CD45RC (p56lck, p59fyn, quinasas Src); CD46 (MCP); CD47 (gp42, IAP, OA3, Neurofilina); CD47R (MEM-133); CD48 (Blast-1, Hulum3, BCM-1, OX-45); CD49c (VLA-3 α , Integrina α 3); CD49d (VLA-4 α , Integrina α 4); CD49e (VLA-5 α , integrina α 5); CD49f (VLA-6 α , Integrina α 6 gpIc); CD50 (ICAM-3); CD52 (CAMPATH-1, HES); CD53 (OX-44); CD54 (ICAM-1); CD55 (DAF); CD56 (Leu-19, NKH-1, NCAM); CD57 (HNK1, Leu-7); CD58 (LFA-3); CD59

(1F5Ag, H19, Protectina, MACIF, MIRL, P-18); CD60a (GD3); CD60b (9-O-acetil GD3); CD60c (7-O acetil GD3); CD62L (L-selectina, LAM-1, LECAM-1, MEL-14, Leu8, TQ1); CD73 (Ecto-5'-nucleotidasa); CD75 (Lactosamina enmascarada con sialo); CD75S (α 2, Lactosamina 6 sialilada); CD81 (TAPA-1); CD82 (4F9, C33, IA-4, KAI1, R2); CD84 (P75, GR6); CD85a (ILT5, LIR3, HL9); CD85j (ILT2, LIR1, MIR7); CD87 (uPAR); CDw92 (p70); CD94 (Kp43);
 5 CD95 (APO-1, FAS, TNFRSF6); CD98 (4F2, FRP-1, RL-388); CD99 (MIC2, E2); CD99R (CD99 Mab restringido); CD100 (SEMA4D); CD102 (ICAM-2); CD108 (SEMA7A, antígeno del grupo sanguíneo JMH); CDw119 (IFN γ R, IFN γ Ra); CD120a (TNFR1, p55); CD120b (TNFR2, p75, TNFR p80); CD 121a (Tipo 1 IL-1R); CD121b (Tipo 2 IL-1R); CD122 (IL2R β); CD124 (IL-4R α); CD126 (IL-6Ra); CD 127 (p90, IL-7R, IL-7R α); CD128a (IL-8Ra, CXCR1, (Renombrado tentativamente como CD181)); CD128b (IL-8Rb, CXCR2, (Renombrado tentativamente como
 10 CD182)); CD130 (gp130); CD132 (Común y cadena, IL-2R γ); CD147 (Basigin, EMMPRIN, M6, OX47); CD148 (HPTP- η , p260, DEP-1); CD150 (SLAM, IPO-3); CD 153 (CD3OL, TNSF8); CD156b (TACE, ADAM17, cSVP); CD158a (KIR2DL1, p58.1); CD158b1 (KIR2DL2, p58.2); CD158b2 (KIR2DL3, p58.3); CD158c (KIR2DS6, KIRX); CD158j (KIR3DL1/S1, p70); CD159F (KIR2DL5); CD158g (KIR2DS5); CD158h (KIR2DS1, p50.1); CD158i (KIR2DS4, p50.3); CD158j (KIR2DS2, p50.2); CCD158k (KIR3DL2, p40); CD159a (NKG2A); CD160 (BY55, NK1, NK28); CD161 (NKR, NKRP1A); CD162 (PSGL-1); CD164 (MGC-24, MUC-24); CD171 (L1CAM, NILE); CD172g (SIRP γ); CD181 (CXCR1, (Anteriormente conocido como CD 128a)); CD 182 (CXCR2, (Anteriormente conocido como CD 128b)); CD183 (CXCR3, GPR9); CD184 (CXCR4, NPY3R); CD185 (CXCR5); CD186 (CXCR6); CD 191 (CCR1, CD 192 (CCR2, CD 193 (CCR3, CD 195 (CCR5, CD 196 (CCR6, CD 197 (CCR7 (era CDw197)); CDw197 (CCR7, EBI1, BLR2); CDw198 (CCR8); CDw199 (CCR9); CD205 (DEC-205); CDw210 (CK); CDw217 (CK);
 20 CDw218a (IL18R α); CDw218b (IL18R β); CD220 (Insulina R); CD221 (IGF1 R); CD222 (M6P-R, IGFII-R); CD223 (LAG-3); CD224 (GGT); CD225 (Leu13); CD226 (DNAM-1, PTA1); CD229 (Ly9); CD230 (Proteína priónica (Prp)); CD244 (2B4, P38, NAIL); CD245 (p220/240); CD247 (cadena Zeta de CD3); CD261 (TRAIL-R1, superfamilia TNF-R, miembro 10a); CD262 (TRAIL-R2, superfamilia TNF-R, miembro 10b); CD263 (TRAIL-R3, superfamilia TNF-R, miembro 10c); CD264 (TRAIL-R4, superfamilia TNF-R, miembro 10d); CD265 (TRANCE-R, superfamilia TNF-R, miembro 11a); CD268 (BAFFR, superfamilia TNF-R, miembro 13C); CD272 (BT-LA); CD275 (B7H2, ICOSL); CD277 (BT3.1, familia B7: Butirofilina 3); CD294 (CRTH2, PGRD2, receptor 44 acoplado a la proteína G); CD295 (LEPR); CD296 (ART1, ADP-ribosiltransferasa 1); CD298 (ATP1B3, subunidad β 3 de la Na K ATPasa); CD300a (CMRF-35H); CD300c (CMRF-35A); CD305 (LAIR1); CD314 (NKG2D); CD316 (EW12); CD317 (BST2); CD319 (CRACC, SLAMF7); CD321 (JAM1); CD322 (JAM2); CDw328 (Siglec7); y CD68 (gp 110, Macrosialina); en el que los nombres
 30 relacionados en paréntesis representan nombres alternativos.

En algunas realizaciones, el direccionamiento de linfocitos T se puede llevar a cabo mediante cualquier resto de direccionamiento que se une, tal como que se une específicamente, a cualquier entidad (por ejemplo, proteína, lípido, hidrato de carbono, molécula pequeña, etc.) que se expresa prominentemente y/o está presente en linfocitos T tras la activación (es decir, dianas de linfocitos T activados). Los restos de direccionamiento de los linfocitos T
 35 activados ilustrativos incluyen, pero sin limitación, CD1a (RA, T6, HTA-1); CD1b (R1); Cd1c (M241,R7); CD1d (R3); CD9 (p24, DRAP-1, MRP-1); CD25 (antígeno Tac, IL-2R α , p55); CD30 (Ber-H2, Ki-1); CD39 (ATP deshidrogenasa, NTPdeshidrogenasa-1); CD45RO (UCHL-1); CD49a (VLA-1 α , Integrina α 1); CD49b (VLA-2 α , gpla, Integrina α 2); CD69 (AIM, EA 1, MLR3, gp34/28, VEA); CD70 (Ki-24, ligando de CD27); CD74 (li, cadena invariante); CD80 (B7, B7-1, BB1); CD86 (B7-2/B70); CD96 (TACTILE); CD97 (BL-KDD/F12); CD101 (IGSF2, P126, V7); CD103 (HML-1, integrina α E, ITGAE); CD107a (LAMP-1); CD107b (LAMP-2); CD109 (8A3, E123 7D1); CD134 (OX40, TNFRSF4); CDw137 (4-1BB, ILA); CD146 (Muc 18, S-endo, MCAM, Mel-CAM); CD152 (CTLA-4); CD154 (CD40L, gp39, TRAP-1, T-BAM); CD166 (AL-CAM, KG-CAM, SC-1, BEN, DM-GRASP); CD178 (Ligando Fas); CD227 (MUC1, PUM, PEM, EMA); CD253 (TRAIL, superfamilia TNF (ligando), miembro 10); CD254 (TRANCE, RANKL, superfamilia TNF (ligando), miembro 11); CD258 (LIGHT, superfamilia TNF (ligando), miembro 14); CD267 (TAC1, superfamilia TNF-R, miembro 13B); CD273 (B7DC, PDL2); CD274 (B7H1, PDL1); CD278 (ICOS); CD279 (PD1); y CD312 (EMR2); en el que los nombres relacionados en paréntesis representan nombres alternativos.

Características moleculares de los restos de direccionamiento

50 Restos de direccionamiento de ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, un "resto de direccionamiento de ácido nucleico" es un ácido nucleico que se une selectivamente a una diana. En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento de ácido nucleico es un aptámero de ácido nucleico. Un aptámero es normalmente un polinucleótido que se une a una estructura de diana específica que está asociada con un órgano, tejido, célula, componente de matriz extracelular, y/o local subcelular concreto. En general, la función de direccionamiento del aptámero se basa en la estructura tridimensional del aptámero. En algunas realizaciones, la unión de un aptámero a una diana está mediado normalmente por la interacción entre dos y/o tres estructuras tridimensionales del aptámero y la diana. En algunas realizaciones, la unión de un aptámero a una diana no está únicamente basada en la secuencia primaria del aptámero, sino que depende de la(s) estructura(s) tridimensional(es) del aptámero y/o la diana. En algunas realizaciones, los aptámeros se unen a sus dianas mediante el emparejamiento de bases complementarias de Watson-Crick que se interrumpe por las estructuras (por ejemplo, bucles en horquilla) que perturban el emparejamiento de bases.

65 En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento de ácido nucleico es un Spiegelmer®. En general, Los Spiegelmers® son ligandos de oligonucleótidos enantioméricos-L de alta afinidad que expresan una elevada resistencia a la degradación enzimático en comparación con los oligonucleótidos D. En algunas realizaciones, Se

pueden diseñar Spiegelmers® y utilizarse exactamente como un aptámero que se diseñaría y utilizaría.

Una persona normalmente experta en la técnica reconocerá que cualquier ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente a una diana, como se describe en el presente documento, se puede usar de acuerdo con la presente invención.

Los ácidos nucleicos de la presente invención (incluyendo los restos de direccionamiento de ácidos nucleicos y/o los ARN funcionales que se van a administrar, *por ejemplo*, agentes de ARNi, ribozimas, ARNt, *etc.*, descritos con más detalle a continuación) pueden prepararse con cualquier técnica disponible incluyendo, aunque no de forma limitativa la síntesis química, la síntesis enzimática, la escisión enzimática o química de un precursor más largo, *etc.* Se conocen en la técnica métodos de sintetizar ARN (véase, *por ejemplo*, Gait, M.J. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, Oxford [Oxfordshire], Washington, DC: IRL Press, 1984; y Herdewijn, P. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: method and applications*, *Methods in molecular biology*, v. 288 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005).

El ácido nucleico que forma el resto de direccionamiento del ácido nucleico puede comprender nucleósidos que se producen naturalmente, nucleósidos modificados, nucleósidos que se producen naturalmente con enlazadores de hidrocarburo (por ejemplo, un alquileo) o un enlazador de poliéter (por ejemplo, un enlazador de PEG) insertado entre uno o más nucleósidos, nucleósidos modificados con hidrocarburo o enlazadores de PEG insertados entre uno o más nucleósidos, o una de sus combinaciones. En algunas realizaciones, los nucleótidos o nucleótidos modificados del resto de direccionamiento de ácido nucleico se pueden sustituir con un enlazador de hidrocarburo o un enlazador de poliéter con la condición de que la afinidad y selectividad de unión del resto de direccionamiento de ácido nucleico no se reduzca sustancialmente mediante la sustitución (por ejemplo, la constante de disociación del resto de direccionamiento de ácido nucleico para la diana no debe ser mayor de aproximadamente 1×10^{-3} M).

Las personas normalmente expertas en la materia apreciarán que los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden comprender nucleótidos completamente de los tipos que se encuentran en los ácidos nucleicos que se producen en la naturaleza, o pueden a su vez incluir uno o más análogos de nucleótidos o tienen una estructura que difiere de otra forma del ácido nucleico que se produce naturalmente. Las patentes de Estados Unidos 6.403.779; 6.399.754; 6.225.460; 6.127.533; 6.031.086; 6.005.087; 5.977.089; y las referencias de dichos documentos divulgan una amplia variedad de análogos y modificaciones de nucleótidos específicos que se pueden usar. Véase Crooke, S. (ed.) *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications* (1ª ed), Marcel Dekker; ISBN: 0824705661, 1ª edición (2001). Por ejemplo, las modificaciones 2' incluyen halo, grupos alcoxi y aliloxi, En algunas realizaciones, el grupo 2'-OH está sustituido por un grupo seleccionado entre H, OR, R, halo, SH, SR₁ NH₂, NH_R, NR₂ o CN, en la que R es alquilo C₁-C₆, alqueno, o alquino, y halo es F, Cl, Br o I. Los ejemplos de enlaces modificados incluyen enlaces de fosforotioato y 5'-N-fosforamidita.

Los ácidos nucleicos que comprenden varios análogos de nucleótidos diferentes, estructuras modificadas, o enlaces internucleósidos que no se producen naturalmente, pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención. Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden incluir nucleósidos naturales (es decir, adenosina, timidina, guanosa, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosa, y desoxicitidina) o nucleósidos modificados. Los ejemplos de nucleótidos modificados incluyen nucleósidos con bases modificadas (por ejemplo, aracitidina, inosina, isoguanosina, nebularina, pseudouridina, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, 2-tiotimidina, 3-desaza-5-azacitidina, 2'-desoxiuridina, 3-nitropirrol, 4-metilindol, 4-tiouridina, 4-tiotimidina, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, 2-tiouridina, 5-bromocitidina, 5-yodouridina, inosina, 6-azauridina, 6-cloropurina, 7-desazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-azaadenosina, 8-azidoadenosina, bencimidazol, M1-metiladenosina, pirrolopirimidina, 2-amino-6-cloro-purina, 3-metil adenosina, 5-propinilcitidina, 5-propiniluridina, 5-bromouridina, 5-fluorouridina, 5-metilcitidina, 7-desazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina, y 2- tiocitidina), bases química o biológicamente modificadas (por ejemplo, bases metiladas), azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, 2'-aminorribosa, 2'-azidorribosa, 2'-O-metilribosa, nucleósidos L-enantiomérico de arabinosa, y hexosa), grupos fosfato modificados (por ejemplo, fosforotioatos y enlaces de 5'-N-fosforamidita) y sus combinaciones. Están fácilmente disponibles monómeros de nucleótidos naturales y modificados para la síntesis química de ácidos nucleicos. En algunos casos, los ácidos nucleicos que comprenden dichas modificaciones presentan propiedades mejoradas con respecto a los ácidos nucleicos que consisten solo en los nucleótidos que se producen naturalmente. En algunas realizaciones, las modificaciones de ácidos nucleicos descritas en el presente documento se utilizan para reducir y/o evitar la digestión por las nucleasas (por ejemplo, exonucleasas, endonucleasas, *etc.*). Por ejemplo, la estructura de un ácido nucleico puede estabilizarse incluyendo análogos de nucleótidos en el 3^{er} extremo de una o ambas hebras a fin de reducir la digestión.

Los ácidos nucleicos no necesitan modificarse uniformemente a lo largo de la longitud completa de la molécula. Pueden existir diferentes modificaciones de nucleótidos y/o estructuras de la cadena principal en varias posiciones en el ácido nucleico. Una persona normalmente experta en la técnica apreciará que los análogos de nucleótidos u otra(s) modificación(es) pueden localizarse en cualquier(cualesquiera) posición(es) de un ácido nucleico de tal manera que la función del ácido nucleico no se vea sustancialmente afectada. Para dar, pero a modo de ejemplo, se pueden localizar modificaciones en cualquier posición de un aptámero de tal manera que la capacidad del aptámero se une específicamente a la diana del aptámero que no se ve afectada simultáneamente. La región modificada

puede estar en el extremo 5' y/o en el extremo 3' de una o ambas hebras. Por ejemplo, se pueden emplear aptámeros modificados en los que 1 a aproximadamente 5 restos en el extremo 5' y/o el extremo 3' de cualquiera de ambas cadenas son análogos de nucleótidos y/o tienen una modificación de la estructura. La modificación puede ser una modificación en el extremo 5' o 3'. Una hebra de ácido nucleico puede comprender al menos un 50 % de nucleótidos no modificados, al menos un 80 % de nucleótidos no modificados, al menos un 90 % de nucleótidos no modificados, o un 100 % de nucleótidos no modificados.

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden, por ejemplo, comprender una modificación en un azúcar, nucleósido, o enlace internucleósidos tales como los descritos en las publicaciones de patente de Estados Unidos 2003/0175950, 2004/0192626, 2004/0092470, 2005/0020525, y 2005/0032733. La presente invención abarca el uso de cualquier ácido nucleico que tenga una cualquiera o más de las modificaciones descritas en el anterior. Por ejemplo, numerosos conjugados terminales, por ejemplo, lípidos tales como colesterol, ácido litocólico, ácido alúrico, o se ha notificado que cadenas largas de alquilo ramificadas mejoran la captación celular. Se pueden ensayar análogos y modificaciones utilizando, por ejemplo, utilizando cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, para seleccionar aquellos que dan como resultado una administración mejorada de un agente terapéutico, la unión específica mejorada de un aptámero a una diana de aptámero, etc. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden comprender uno o más enlaces de nucleósidos no naturales. En algunas realizaciones, uno o más nucleótidos internos en el extremo 3', extremo 5' o en ambos extremos 3' y 5' del aptámero están invertidos para dar como resultado un enlace tal como un enlace 3' - 3' o un enlace 5' - 5'.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención no son sintéticos, sino que son entidades que se producen naturalmente que se han aislado a partir de sus entornos naturales.

Restos de direccionamiento de moléculas pequeñas. En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento de acuerdo con la presente invención puede ser una molécula pequeña. En determinadas realizaciones, las moléculas pequeñas tienen menos de aproximadamente 2000 g/mol de tamaño. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas tienen menos de aproximadamente 1500 g/mol o menos de aproximadamente 1000 g/mol. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas tienen menos de aproximadamente 800 g/mol o menos de aproximadamente 500 g/mol.

En determinadas realizaciones, una molécula pequeña es oligomérica. En determinadas realizaciones, una molécula pequeña es no oligomérica. En determinadas realizaciones, una molécula pequeña es un producto natural o un compuesto de tipo producto natural que tiene una estructura parcial (por ejemplo, una subestructura) basada en la estructura completa de un producto natural. En determinadas realizaciones, una molécula pequeña es un producto sintético. En algunas realizaciones, una molécula pequeña puede proceder de una biblioteca química. En algunas realizaciones, una molécula pequeña puede proceder de una biblioteca histórica de una compañía farmacéutica. En determinadas realizaciones, una molécula pequeña es un fármaco homologado por la U.S. Food and Drug Administration como se proporciona en el U.S. Code of Federal Regulations (C.F.R.).

Una persona normalmente experta en la técnica apreciará que cualquier molécula pequeña que se une específicamente a una diana deseada, como se describe en el presente documento, se puede usar de acuerdo con la presente invención.

Resto de direccionamiento de proteínas. En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento de acuerdo con la presente invención puede ser una proteína o péptido. En determinadas realizaciones, los péptidos varían desde aproximadamente 5 a aproximadamente 100, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50, de aproximadamente 10 a aproximadamente 75, de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 o de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 aminoácidos de tamaño. En algunas realizaciones, una secuencia peptídica puede estar basada en la secuencia de una proteína. En algunas realizaciones, una secuencia peptídica puede ser una disposición aleatoria de aminoácidos.

Los términos "polipéptido" y "péptido" se usan de manera indistinta en el presente documento, refiriéndose "péptido" normalmente a un polipéptido que tiene una longitud de menos de aproximadamente 100 aminoácidos. Los polipéptidos pueden contener L-aminoácidos, Los D-aminoácidos, o ambos y pueden contener cualquiera de varias modificaciones o análogos de aminoácidos conocidos en la técnica. Las modificaciones útiles incluyen, por ejemplo, acetilación terminal, amidación, lipidación, fosforilación, glucosilación, acilación, farnesilación, sulfatación, etc.

Las proteínas ilustrativas que se pueden usar como restos de direccionamiento de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, receptores, citocinas, hormonas peptídicas, glucoproteínas, glucopéptidos, proteoglicanos, proteínas derivadas de bibliotecas combinatorias (por ejemplo, Avimers™, Affibodies®, etc.), y sus porciones características. Se pueden usar proteínas de unión sintéticas tales como Nanobodies™, AdNectins™, etc. En algunas realizaciones, los restos de direccionamiento de proteínas pueden ser péptidos.

Una persona normalmente experta en la materia apreciará que se puede usar cualquier proteína y/o péptido que se una específicamente a la diana deseada, como se describe en el presente documento, se puede usar de acuerdo con la presente invención.

5 En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento puede ser un anticuerpo o su porción característica. El término "anticuerpo" se refiere a cualquier inmunoglobulina, tanto natural como producida de forma completa o parcialmente sintética y a sus derivados. Un anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Un anticuerpo puede ser un miembro de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo cualquiera de las clases humanas: IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE.

10 Como se usa en el presente documento, un fragmento de anticuerpo (es decir, una porción característica de un anticuerpo) se refiere a cualquier derivado de un anticuerpo que sea menor que la longitud completa. En algunas realizaciones, un fragmento de anticuerpo puede retener al menos una porción significativa de la capacidad de unión específica del anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de dichos fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, diacuerpos dsFv, y fragmentos Fd. Los fragmentos de anticuerpo incluyen también, pero sin limitación, fragmentos Fc.

15 Un fragmento de anticuerpo puede producirse mediante cualquier medio. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede producirse enzimática o químicamente mediante fragmentación de un anticuerpo intacto y/o este puede producirse de forma recombinante a partir de un gen que codifica la secuencia parcial del anticuerpo. De forma alternativa o adicional, un fragmento de anticuerpo puede producirse de forma completa o parcialmente sintética. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un fragmento de anticuerpo monocatenario. De forma alternativa o adicional, un fragmento de anticuerpo puede comprender múltiples cadenas que se unen juntas, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un complejo multimolecular. un fragmento de anticuerpo funcional comprenderá normalmente al menos aproximadamente 50 aminoácidos y más normalmente comprenderá al menos aproximadamente 200 aminoácidos.

20 En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden incluir anticuerpos quiméricos (por ejemplo, "anticuerpos humanizados") y anticuerpos monocatenarios (recombinantes) En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden tener funciones efectoras reducidas y/o moléculas biespecíficas. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden incluir fragmentos producidos mediante una biblioteca de expresión en Fab.

25 Los Fv monocatenarios (scFv) son fragmentos de anticuerpos recombinantes que consisten solo en la cadena variable ligera (VL) y la cadena pesada variable (VH) unidas covalentemente entre sí por un polipéptido enlazador. Tanto VL como VH pueden comprender un dominio NH₂ en el extremo. El polipéptido enlazador puede ser de longitud y composición variables siempre que los dos dominios estéricos se encuentren formando un puente sin interferencias estéricas significativas. Normalmente, los enlazadores comprenden principalmente extensiones de glicina y restos de serina con algunos restos de ácido glutámico o lisina intercalados para la solubilidad.

30 Los diacuerpos son scFv dimericos. Los diacuerpos tienen normalmente enlazadores peptídicos más cortos que la mayoría de los scFv, y muestran a menudo preferencia por asociarse como dímeros.

35 Un fragmento Fv es un fragmento de anticuerpo que consiste en un dominio VH y un dominio VL que se mantienen juntos mediante interacciones no covalentes. El término "dsFv", como se usa en el presente documento se refiere a un Fv con un enlace disulfuro intermolecular diseñado mediante ingeniería para estabilizar la pareja VH-VL.

40 Un fragmento F(ab')₂ es un fragmento de anticuerpo esencialmente equivalente al obtenido a partir de inmunoglobulinas mediante la digestión con una enzima pepsina a un pH de 4,0-4,5. El fragmento puede producirse de forma recombinante.

45 Un fragmento Fab' es un fragmento de anticuerpo esencialmente equivalente al obtenido mediante reducción del puente o puentes disulfuro que se unen a dos fragmentos de la cadena pesada en el fragmento F(ab')₂. El fragmento Fab' puede producirse de forma recombinante.

50 Un fragmento Fab es un fragmento de anticuerpos esencialmente equivalente al obtenido mediante digestión de inmunoglobulinas con una enzima (por ejemplo, papaína). El fragmento Fab puede producirse de forma recombinante. El segmento de la cadena pesada del fragmento Fab es el fragmento Fd.

55 Restos de direccionamiento de hidratos de carbono. En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento de acuerdo con la presente invención puede comprender un hidrato de carbono. En algunas realizaciones, un hidrato de carbono puede ser un polisacárido que comprende azúcares sencillos (o sus derivados) unidos mediante enlaces glucosídicos, tal como se conoce en la técnica. Dichos azúcares pueden incluir, pero sin limitación, glucosa, fructosa, galactosa, ribosa, lactosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, celobiosa, manosa, xilosa, arabinosa, ácido glucurónico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina, y ácido neuramínico. En algunas realizaciones, un hidrato de carbono puede ser uno o más de pululano, celulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxicelulosa, metilcelulosa, dextrano, ciclodextrano, glucógeno, almidón, hidroxietilalmidón, carragenato, glicona,

amilosa, quitosán, N,O-carboxilmetilquitosán, algina y ácido algínico, almidón, quitina, heparina, konjac, glucomanano, pustulano, heparina, ácido hialurónico, curdlan, y xantano.

5 En algunas realizaciones, el hidrato de carbono puede estar aminado, carboxilado, y/o sulfatado. En algunas realizaciones, los polisacáridos hidrófilos pueden estar modificados para volverse hidrófobos introduciendo un gran número de grupos hidrófobos de cadenas secundarias. En algunas realizaciones, un hidrato de carbono hidrófobo puede incluir acetato de celulosa, acetato de pululano, acetato de konjac, acetato de amilosa, y acetato de dextrano.

10 Una persona normalmente experta en la materia apreciará que se puede usar cualquier hidrato de carbono se une específicamente a una diana deseada, como se describe en el presente documento, se puede usar de acuerdo con la presente invención.

15 Restos de direccionamiento de lípidos. En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento de acuerdo con la presente invención puede comprender uno o más grupos de ácidos grasos o sus sales. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede comprender hidrocarburos digeribles, de cadena larga (por ejemplo, C₈-C₅₀), sustituidos o no sustituidos. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser un ácido graso C₁₀-C₂₀ o una de sus sales. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser un ácido graso C₁₅-C₂₀ o una de sus sales. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser un ácido graso C₁₅-C₂₅ o una de sus sales. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede estar insaturado. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede estar poliinsaturado. En algunas realizaciones, un doble enlace de un grupo de ácido graso insaturado puede estar en la conformación *cis*. En algunas realizaciones, un doble enlace de un ácido graso insaturado puede estar en la conformación *trans*.

25 En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser uno o más de ácido butírico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behénico, o lignocérico. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser uno o más de ácido palmitoleico, oleico, vacénico, linoleico, alfa-linoleico, gamma-linoleico, araquidónico, gadoleico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico, o ácido erúcido.

30 Una persona normalmente experta en la materia apreciará que cualquier grupo de ácido graso que se pueda unir específicamente a una diana deseada, como se describe en el presente documento, se puede usar de acuerdo con la presente invención.

Restos de direccionamiento novedosos

35 Se puede utilizar cualquier resto de direccionamiento novedoso en los nanotransportadores de acuerdo con la presente invención. Se puede usar cualquier método conocido en la materia para diseñar, identificar, y/o aislar novedosos restos de direccionamiento. Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas normalizadas que utilizan bibliotecas de moléculas y ensayos de unión *in vitro* para identificar novedosos restos de direccionamiento.

40 Se pueden diseñar restos de direccionamiento de ácidos nucleicos (por ejemplo, aptámeros, Spiegelmers®) y/o identificarse utilizando cualquier método disponible. En algunas realizaciones, los restos de direccionamiento de ácidos nucleicos se diseñan y/o identifican identificando restos de direccionamiento de ácidos nucleicos a partir de una mezcla candidata de ácidos nucleicos. La evolución sistémica de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX), o una de sus variaciones, es un método comúnmente utilizado para identificar restos de
45 direccionamiento de ácidos nucleicos que se unen a una diana de una mezcla candidata de ácidos nucleicos (véase, *por ejemplo*, Las patentes de Estados Unidos 6.482.594; 6.458.543; 6.458.539; 6.376.190; 6.344.318; 6.242.246; 6.184.364; 6.001.577; 5.958.691; 5.874.218; 5.853.984; 5.843.732; 5.843.653; 5.817.785; 5.789.163; 5.763.177; 5.696.249; 5.660.985; 5.595.877; 5.567.588; y 5.270.163). De forma alternativa o adicional, La optimización combinatoria Polyplex *in vivo* (PICO) es un método que se puede usar para identificar restos de direccionamiento de
50 ácidos nucleicos (por ejemplo, aptámeros) que se unen a una diana de una mezcla candidata de ácidos *in vivo* y/o *in vitro* y se describe en la solicitud PCT US06/47975 en tramitación con la presente, titulada "System for Screening Particles, presentada el 15 de diciembre de 2006.

Agentes inmunoestimuladores

55 En algunas realizaciones, los nanotransportadores pueden transportar uno o más agentes inmunoestimuladores que pueden ayudar a estimular respuestas inmunitarias. En algunas realizaciones, los agentes inmunoestimuladores refuerzan las respuestas inmunitarias activando las APC para potenciar su capacidad inmunoestimuladora. En algunas realizaciones, los agentes inmunoestimuladores refuerzan respuestas inmunitarias amplificando las
60 respuestas de los linfocitos a antígenos específicos. En algunas realizaciones, los agentes inmunoestimuladores refuerzan respuestas inmunitarias induciendo la liberación local de mediadores, dichas citoquinas proceden de varios tipos de células.

65 En algunas realizaciones, todos los agentes inmunomoduladores de un nanotransportador de vacunas son idénticos entre sí. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende un número de diferentes tipos de agentes inmunoestimuladores. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende múltiples

agentes inmunoestimuladores individuales, todos los cuales son idénticos entre sí. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende exactamente un tipo de agente inmunoestimulador. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende exactamente dos tipos distintos de agentes inmunoestimuladores. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende más de dos tipos
5 distintos de agentes inmunoestimuladores.

En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende un único tipo de agente inmunoestimulador que estimula linfocitos B y linfocitos T. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende dos tipos de agentes inmunoestimuladores, en el que el primer tipo de agente inmunoestimulador estimula linfocitos B, y
10 el segundo tipo de agente inmunoestimulador estimula linfocitos T. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende más de dos tipos distintos de agentes inmunoestimuladores,, en el que uno o más tipos de agentes inmunoestimuladores estimulan linfocitos B, y uno o más tipos de agentes inmunoestimuladores estimulan linfocitos T.

En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende al menos un tipo de agente inmunomodulador que está asociado con la superficie exterior del nanotransportador de vacunas. La asociación es covalente. En algunas realizaciones, la asociación covalente está mediada por uno o más enlazadores. La asociación de agentes inmunoestimuladores con los nanotransportadores de vacunas se describe en detalle a
15 continuación, en la sección titulada "Producción de nanotransportadores de vacunas."

En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende una membrana lipídica (por ejemplo, una bicapa lipídica, una monocapa lipídica, etc.), en el que al menos un tipo de agente inmunomodulador está asociado con la membrana lipídica. En algunas realizaciones, al menos un tipo de agente inmunoestimulador está incluido en la membrana lipídica. En algunas realizaciones, al menos un tipo de agente inmunoestimulador está incluido en la
20 luz de una bicapa lipídica. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende al menos un tipo de agente inmunoestimulador que está asociado con la superficie interior de la membrana lipídica. En algunas realizaciones, al menos un tipo de agente inmunoestimulador puede estar localizado en múltiples localizaciones de un nanotransportador de vacunas. En algunas realizaciones, un primer tipo de agente inmunoestimulador y un segundo tipo de agente inmunoestimulador puede estar en el mismo local de un nanotransportador de vacunas (por
25 ejemplo, ambos pueden estar asociados a la superficie exterior de un nanotransportador de vacunas). Una persona normalmente experta en la materia reconocerá que los ejemplos precedentes son solo representativos de las muchas maneras diferentes en las que múltiples agentes inmunoestimuladores pueden estar asociados con diferentes locales de nanotransportadores de vacunas. Múltiples agentes inmunoestimuladores pueden estar localizados en cualquier combinación de locales de nanotransportadores de vacunas.
30

Los agentes inmunoestimuladores incluyen interleuquinas, Interferón, citocinas, etc. En realizaciones específicas, un agente inmunoestimulador puede ser un agonista natural o sintético para un receptor de tipo Toll (TLR). En realizaciones específicas, los nanotransportadores de vacunas incorporan un ligando para un receptor de tipo toll (TLR)-7, tal como CpGs, que induce la producción de interferón de tipo I. Los agentes inmunoestimuladores incluyen un agonista para la molécula superficial de DC CD40. Para estimular la inmunidad más bien que la tolerancia, un agente inmunoestimulador puede promover la maduración de las DC (necesarias para el cebado de los linfocitos T no expuestos anteriormente) y la producción de citoquinas, tal como interferones de tipo I, que promueven las respuestas de anticuerpos y la inmunidad antivírica. En algunas realizaciones, un agente inmunoestimulador puede ser un agonista de TLR-4, tal como un lipopolisacárido bacteriano (LPS), VSV-G, y/o HMGB-1. Los agentes
35 inmunomoduladores incluyen citoquinas, que son proteínas o factores biológicos pequeños (en el intervalo de 5 kD - 20 kD) que se liberan por células y tienen efectos específicos sobre la interacción célula-célula, la comunicación y el comportamiento de otras células. Los agentes inmunoestimuladores incluyen estímulos proinflamatorios liberados desde células necróticas (por ejemplo, cristales de urato). Los agentes inmunoestimuladores incluyen componentes activados de la cascada del complemento (por ejemplo, CD21, CD35, etc.). Los agentes inmunoestimuladores incluyen componentes activados de complejos inmunitarios. Los agentes inmunoestimuladores incluyen los agonistas de TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-7, TLR-8, TLR-9, y TLR-10. Los agentes inmunoestimuladores incluyen también agonistas de los receptores del complemento, tales como una molécula que se une a CD21 o CD35. Un agonista del receptor del complemento induce la opsonización endógena del complemento del nanotransportador. Los agentes inmunoestimuladores incluyen también un agonistas de los
40 receptores de las citoquinas, tales como una citoquina. Los agonistas de los receptores de las citoquinas incluyen una molécula pequeña, anticuerpo, proteína de fusión, o aptámero.
45

En algunas realizaciones, existe más de un tipo de agente inmunoestimulador. En algunas realizaciones, los diferentes agentes inmunoestimuladores actúan cada uno en una ruta diferente. Los agentes inmunoestimuladores, por lo tanto, pueden ser receptores de tipo Toll diferentes, un receptor de tipo Toll y CD40, un receptor de tipo Toll y un componente del inflammasoma, etc.
50

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden nanotransportadores de vacunas formulados con uno o más adyuvantes. El término "adyuvante", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente que no constituye un antígeno específico, pero que refuerza la respuesta inmunitaria del antígeno administrado.
55

En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas se formulan con uno o más adyuvantes tales como adyuvantes de tipo gel (por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato de calcio, etc.), adyuvantes microbianos (por ejemplo, secuencias de ADN inmunomoduladoras que incluyen motivos CpG; endotoxinas tales como monofosforil lípido A; exotoxinas tales como la toxina del cólera, la toxina lábil al calor de *E. coli* y la toxina pertussis; dipéptido de muramilo, etc.); adyuvantes basados en emulsiones oleosas y emulsionantes (por ejemplo, adyuvante de Freund, MF59 [Novartis], SAF, etc.); adyuvantes particulados (por ejemplo, liposomas, microesferas biodegradables, saponinas, etc.); adyuvantes sintéticos (por ejemplo, copolímeros en bloque no iónicos, análogos de péptidos de muramilo, polifosfaceno, polinucleótidos sintéticos, etc.), y/o sus combinaciones. Otros adyuvantes ilustrativos incluyen algunos polímeros (por ejemplo, polifosfacenos, descritos en la patente de Estados Unidos. 5.500.161), QS21, escualeno, tetraclorodecaóxido, etc.

Ensayos para la activación de linfocitos T

En algunas realizaciones, se pueden utilizar diversos ensayos a fin de determinar si se ha estimulado una respuesta inmunitaria en un linfocito T o en un grupo de linfocitos T (*es decir*, si un linfocito T o un grupo de linfocitos T se ha llegado a "activar"). En algunas realizaciones, la estimulación de una respuesta inmunitaria en linfocitos T puede determinarse midiendo la producción de citoquinas inducidas por antígenos por los linfocitos T. En algunas realizaciones, la estimulación de una respuesta inmunitaria en linfocitos T puede determinarse midiendo la proliferación inducida por antígenos de IFN γ , IL-4, IL-2, IL-10, IL-17 y /o TNF α por linfocitos T. En algunas realizaciones, puede medirse la producción de citoquinas por los linfocitos T inducida por antígenos mediante la tinción de citoquinas intracelulares seguida por citometría de flujo. En algunas realizaciones, puede medirse la producción de citoquinas por los linfocitos T inducida por antígenos mediante la tinción de captura superficial seguida por citometría de flujo. En algunas realizaciones, puede medirse la producción de citoquinas por los linfocitos T inducida por antígenos determinando la concentración de citoquinas en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos T activados. En algunas realizaciones, esto puede medirse mediante ELISA.

En algunas realizaciones, puede medirse la producción de citoquinas por los linfocitos T inducida por antígenos mediante el ensayo ELISPOT. En general, los ensayos ELISPOT emplean una técnica muy similar a la técnica de enzimoanálisis de absorción (ELISA) de tipo sándwich. Un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, etc.) se reviste asépticamente sobre una microplaca con un soporte de PVDF (fluoruro de polivinilideno). Los anticuerpos se seleccionan para su especificidad para la citoquina en cuestión. La placa se bloquea (por ejemplo, con una proteína sérica que es no reactiva de los anticuerpos en el ensayo). Las células de interés se siembran en placas a densidades variables, junto con antígenos o mitógenos, y a continuación se colocan en una incubadora de CO $_2$ a 37 °C humidificada durante un periodo de tiempo especificado. Las citoquinas secretadas por las células activadas se capturan localmente por el anticuerpo revestido de la membrana de PVDF de elevada área superficial. Tras lavar los pocillos para retirar las células, los desechos, y los componentes del medio, se añade a los pocillos un anticuerpo secundario (por ejemplo, un anticuerpo policlonal biotinilado) específico para la citoquina. Este anticuerpo es reactivo con un epítipo distinto de la citoquina diana y se emplea de esta manera para detectar la citoquina capturada. Tras un lavado para eliminar cualquier anticuerpo biotinilado no unido, la citoquina detectada se visualiza a continuación utilizando una avidina-HRP y un sustrato precipitante (por ejemplo, AEC, BCIP/NBT). El producto final coloreado (una mancha, usualmente, una mancha azul negruzca) representa normalmente una célula individual productora de citoquinas. Las manchas pueden contarse manualmente (por ejemplo, con un microscopio de disección) o utilizando un lector automatizado para capturar las imágenes de los micropocillos y para analizar el número y el tamaño de las manchas. En algunas realizaciones, cada mancha está correlacionada con una única célula productora de citoquinas.

En algunas realizaciones, se dice que va a estimularse una respuesta inmunitaria en los linfocitos T si entre aproximadamente un 1 % y aproximadamente un 100 % de linfocitos T específicos de antígenos producen citoquinas. En algunas realizaciones, se dice que va a estimularse una respuesta inmunitaria en los linfocitos T si al menos aproximadamente el 1 %, al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % de linfocitos T específicos de antígenos producen citoquinas.

En algunas realizaciones, se dice que va a estimularse una respuesta inmunitaria en los linfocitos T si los sujetos inmunizados comprenden al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 500 veces, al menos aproximadamente 1000 veces, al menos aproximadamente 5000 veces, al menos aproximadamente 10.000 veces, al menos aproximadamente 50.000 veces, al menos aproximadamente 100.000 veces o más de al menos aproximadamente 100.000 veces más células productoras de citoquinas que los controles no expuestos anteriormente a tratamiento.

En algunas realizaciones, la estimulación de una respuesta inmunitaria en linfocitos T puede determinarse midiendo la proliferación de linfocitos T inducida por antígenos. En algunas realizaciones, la producción inducida por antígenos puede medirse como la captación de H 3 -timidina en linfocitos T en división (denominado algunas veces como ensayo de transformación de linfocitos", o "LTT"). En algunas realizaciones, se dice que la proliferación inducida por antígenos ha ocurrido si la captación de H 3 -timidina (dada como el número de cuentas de un contador γ) es al

menos de aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 500 veces, al menos aproximadamente 1000 veces, al menos aproximadamente 5000 veces, al menos aproximadamente 10.000 veces, o más que al menos aproximadamente 10.000 veces más que un control no expuesto anteriormente a tratamiento.

En algunas realizaciones, puede medirse la producción inducida por antígenos mediante citometría de flujo. En algunas realizaciones, puede medirse la proliferación inducida por antígenos mediante el ensayo de dilución del éster de carboxifluoresceína succinimidilo (CFSE). CFSE es un colorante permeante de membrana, fluorescente, que se une a los grupos amino de las proteínas citoplásmicas con su grupo reactivo de succinimidilo, (por ejemplo, proteínas de linfocitos T). Cuando las células se dividen, las proteínas marcadas con CFSE se distribuyen igualmente entre las células hijas, reduciendo de esta manera a la mitad la fluorescencia celular con cada división. Por consiguiente, los linfocitos T específicos de antígenos pierden su fluorescencia tras el cultivo en presencia del antígeno respectivo (CFSE^{low}) y son distinguibles de otras células en cultivo (CFSE^{high}). En algunas realizaciones, se dice que la proliferación inducida por antígenos ha ocurrido si la dilución CFSE (proporcionada como porcentaje de células CFSE^{low} de todas las células CFSE+) es al menos de aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 100 %.

En algunas realizaciones, se dice que se va estimular una respuesta inmunitaria en los linfocitos T si los marcadores celulares de la activación de linfocitos T se expresan a diferentes niveles (por ejemplo, niveles superior o inferior) con respecto a las células no estimuladas. En algunas realizaciones, CD 11 a CD27, CD25, CD40L, CD44, CD45RO, y/o CD69 se expresan mucho más en linfocitos T activados que en linfocitos T no estimulados. En algunas realizaciones, L-selectina (CD62L), CD45RA, y/o CCR7 se expresan mucho menos en linfocitos T activados que en linfocitos T no estimulados.

En algunas realizaciones, una respuesta inmunitaria en linfocitos T se mide evaluando la citotoxicidad por los linfocitos T CD8⁺ contra las células diana pulsadas por antígenos. Por ejemplo, se puede llevar a cabo un ensayo de liberación del ⁵¹Cr (51Cr). En este ensayo, los linfocitos T CD8⁺ efectoros se unen a las células infectadas que presentan péptidos víricos sobre las MHC de clase I y señalan las células infectadas para experimentar la apoptosis. Si se marcan las células con ⁵¹Cr antes de que se añadan los linfocitos T CD8⁺ efectoros, la cantidad de ⁵¹Cr liberado en el sobrenadante es proporcional al número de dianas destruidas.

Una persona normalmente experta en la materia reconocerá que los ensayos descritos anteriormente son solo métodos ilustrativos que podrían utilizarse a fin de determinar si se ha producido la activación de linfocitos T. Cualquier ensayo conocido por un experto en la materia que se pueda usar para determinar si se ha producido la activación de linfocitos T se encuentra comprendido en el alcance de la presente invención. Los ensayos descritos en el presente documento así como los ensayos adicionales que podrían utilizarse para determinar si se ha producido la activación de linfocitos T se describen en Current Protocols in Immunology (John Wiley & Sons, Hoboken, NY, 2007).

Linfocitos B

La presente invención proporciona nanotransportadores de vacunas para la administración de, por ejemplo, agentes inmunomoduladores a las células del sistema inmunitario. En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas comprenden al menos un agente inmunomodulador que puede presentarse a los linfocitos B (es decir, antígenos de linfocitos B).

Agentes inmunomoduladores

Los linfocitos B y los linfocitos T reconocen el antígeno mediante diferentes mecanismos. Como se ha descrito anteriormente, los linfocitos T reconocen el antígeno en una forma procesada (por ejemplo, como un fragmento peptídico presentado por una molécula MHC de APC al receptor de linfocitos T). Los linfocitos B reconocen antígenos en su forma nativa. Los linfocitos B reconocen antígenos libres (por ejemplo, solubles) en sangre o linfa utilizando receptores de linfocitos B (BCR) y/o inmunoglobulinas unidas a membrana.

El agente inmunomodulador puede ser un antígeno de linfocitos B. los antígenos de linfocitos B incluyen, aunque no de forma limitativa, proteínas, péptidos, pequeñas moléculas e hidratos de carbono. En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos B es una glucoproteína o glucopéptido asociado con un agente infeccioso. El agente infeccioso puede ser una bacteria, virus, hongo, protozoo, o parásito. En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos B es un antígeno poco inmunógeno. En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos B es una sustancia adictiva o una de sus porciones.

El antígeno de linfocitos B puede ser una toxina, tal como una toxina de un arma química, tal como una toxina botulínica, fosfeno, O-Alquilo (<C10, incl. cicloalquil) alquilo (Me, Et, n-Pr o i-Pr)-fosfonofluoridatos (por ejemplo,

Sarín: O-Isopropil metilfosfonofluoridato, Soman: O-Pinacolil metilfosfonofluoridato), O-Alquilo (<C10, incl. cicloalquilo) N,N-dialquilo (Me, Et, n-Pr o i-Pr) fosforamidocianidatos (por ejemplo, Tabun: O-Etil N,N-dimetilfosforamidocianidato), O-Alquilo (H o <C10, incl. cicloalquilo) S-2- dialquilo (Me, Et, n-Pr o i-Pr)-aminoetil alquilo (Me, Et, n- Pr o i-Pr) fosfonotiolatos y las sales alquiladas o protonadas correspondientes (por ejemplo, VX: O-Etil S-2-diisopropilaminoetil metilfosfonotiolato), Mostazas de azufre: Sulfuro de 2-cloroetilclorometilo, Gas mostaza: sulfuro de Bis(2-cloroetilo), Bis(2-cloroetiltio)metano, Sesquimostazas: 1,2-Bis(2-cloroetiltio)etano, 1,3-Bis(2-cloroetiltio)-n-propano, 1,4- Bis(2-cloroetiltio)-n-butano, 1,5- Bis(2-cloroetiltio)-n-pentano, Bis(2-cloroetiltiometil)éter, Mostaza O: Bis(2-cloroetiltio)éter, Lewisites: Lewisite 1: 2-Clorovinildicloroarsina, Lewisite 2: Bis(2-clorovinil)cloroarsina, Lewisite 3: Tris(2-clorovinil)arsina, Mostazas de nitrógeno: HN1: Bis(2-cloroetil)etilamina, HN2: Bis(2-cloroetil)metilamina, HN3: Tris(2-cloroetil)amina, Saxitoxina, Ricina, Amiton: O,O-Dietil S-(2-(dietilamino)etil)fosforotiolato y las sales alquiladas o protonadas correspondientes, PFIB: 1,1,3,3,3-Pentafluoro-2-(trifluorometil)-1-propeno, 3-Quinuclidinil bencilato (BZ), Fosgeno: Dicloruro de carbonilo, Cloruro de cianógeno, Cianuro de hidrógeno y Cloropicrina: Tricloronitrometano.

15 El antígeno de linfocitos B puede ser también un agente peligroso para el medio ambiente. Los agentes peligrosos para el medio ambiente incluyen, pero sin limitación, arsénico, plomo, mercurio, cloruro de vinilo, bifenilos policlorados, benceno, hidrocarburos aromáticos policíclicos, cadmio, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, cloroformo, DDT, P,P', aroclor 1254, aroclor 1260, dibenzo(a,h)antraceno, tricloroetileno, dieldrina, cromo hexavalente y DDE, P,P'. Los ejemplos de dichos agentes incluyen aquellos proporcionados en otra parte en el presente documento.

En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos B es un autoantígeno. En otras realizaciones, el antígeno de linfocitos B es un aloantígeno, un alérgeno, un sensibilizador de contacto, un antígeno de enfermedad degenerativa, un hapteno, un antígeno de enfermedad infecciosa, un antígeno de cáncer, un antígeno de enfermedad atópica, un antígeno de enfermedad autoinmunitaria, una sustancia adictiva, un xenoantígeno, o una enzima de enfermedad metabólica o uno de sus productos enzimáticos. Los ejemplos de dichos antígenos incluyen aquellos proporcionados en otra parte en el presente documento.

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona nanotransportadores de vacunas que comprenden, por ejemplo, uno o más agentes inmunomoduladores. En algunas realizaciones, los nanotransportadores inventivos que comprenden uno o más agentes inmunomoduladores se usan como vacunas. En algunas realizaciones, se puede optimizar la presentación del antígeno a los linfocitos B presentando agentes inmunomoduladores estructuralmente intactos sobre la superficie de los nanotransportadores. En algunas realizaciones, los agentes inmunomoduladores estructuralmente intactos se presentan sobre la superficie de nanotransportadores de vacunas a un número de copias y/o densidad elevados.

En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador puede comprender proteínas o péptidos aislados y/o recombinantes, organismos y virus inactivados, organismos y virus muertos, organismos o virus genéticamente alterados, y extractos celulares. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador puede comprender ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, y/o moléculas pequeñas. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador es aquel que estimula una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, una agente inmunomodulador es un antígeno. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador se usa para vacunas. Se puede encontrar una descripción adicional de agentes inmunomoduladores en la sección anterior titulada "Linfocitos B."

Tal como se ha discutido anteriormente, un nanotransportador de vacunas puede comprender un único tipo de agente inmunomodulador que estimula los linfocitos B y los linfocitos T. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende dos tipos de agentes inmunomoduladores, en el que el primer tipo de agente inmunoestimulador estimula linfocitos B, y el segundo tipo de agente inmunoestimulador estimula linfocitos T. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende más de dos tipo distintos de agentes inmunomoduladores, en el que uno o más tipos de agentes inmunomoduladores estimulan los linfocitos B, y uno o más tipos de agentes inmunomoduladores estimulan los linfocitos T.

Restos de direccionamiento

Tal como se ha discutido anteriormente, los nanotransportadores inventivos comprende uno o más restos de direccionamiento. para una descripción de las propiedades generales y específicas de los restos de direccionamiento de acuerdo con la presente invención, véase el subencabezado titulado "Restos de direccionamiento" en la sección anterior titulada "*Linfocitos T*". En algunas realizaciones, los restos de direccionamiento se dirigen a tipos concretos de células. En determinadas realizaciones, una diana es un marcador de linfocitos B. En algunas realizaciones, una diana de linfocitos T es un antígeno que se expresa en linfocitos T pero no en linfocitos no B. En algunas realizaciones, una diana de linfocito T es un antígeno que es más prevalente en linfocitos T que en linfocitos no B.

En determinadas realizaciones, una diana es un marcador SCS-Mph. En algunas realizaciones, una diana SCS-Mph es un antígeno que se expresa en SCS-Mph pero no en no SCS-Mph. En algunas realizaciones, una diana SCS-

Mph es un antígeno que es más prevalente en SCS-Mph que en no SCS-Mph. Se relacionan a continuación los marcadores de SCS-Mph ilustrativos en la sección titulada “*Células macrófagas del seno subcapsular*” e incluyen aquellos proporcionados en otra parte en el presente documento.

5 En determinadas realizaciones, una diana es un marcador de FDC. En algunas realizaciones, una diana de FDC es un antígeno que se expresa en FDC pero no en no FDC. En algunas realizaciones, una diana de FDC es un antígeno que es más prevalente en FDC que en no FDC. Se relacionan a continuación los marcadores de FDC ilustrativos en la sección titulada “*Células dendríticas foliculares*” e incluyen aquellos proporcionados en otra parte en el presente documento.

10 En algunas realizaciones, una diana se expresa preferentemente en tipos de células concretos. Por ejemplo, la expresión de un SCS-Mph FDC, y/o linfocitos B en SCS-Mph FDC, y/o linfocitos B está al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces o al menos 1000 veces expresada en exceso en SCS-Mph, FDC, y/o linfocitos B con respecto a una población de referencia. En algunas realizaciones, una población de referencia puede comprender no SCS-Mph, FDC, y/o linfocitos B.

15 En algunas realizaciones, la expresión de un SCS-Mph, FDC, y/o la diana de linfocitos B en SCS-Mph, FDC, y/o linfocitos B está al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces o al menos 1000 veces expresada en exceso en SCS-Mph, FDC, y/o linfocitos B con respecto a una población de referencia. En algunas realizaciones, una población de referencia puede comprender SCS-Mph, FDC, y/o linfocitos B.

Células macrófagas del seno subcapsular

25 La presente invención abarca el reconocimiento de que el direccionamiento de antígenos a los macrófagos del seno subcapsular (SCS-Mph) está implicado en la presentación temprana eficaz de los patógenos que se transmiten a través de la linfa, tales como virus, a los linfocitos B foliculares (Figura 2). Como se describe en el Ejemplo 1, tras la inyección subcutánea del virus de la estomatitis vesicular (VSV) o adenovirus (AdV) en la almohadilla plantar de ratones, las partículas víricas se retuvieron de forma eficaz y selectiva se detuvieron por los SCS-Mph CD169+ en los ganglios linfáticos popliteales drenantes. Los linfocitos B transgénicos para el receptor de linfocitos B (BCR) específico de VSV en estos ganglios linfáticos se activaron rápidamente y generaron títulos de anticuerpos extremadamente altos tras este estímulo vírico. El agotamiento de los SCS-Mph mediante inyección de liposomas cargados con clodronato (que es tóxico para los Mph) impidió la activación temprana de los linfocitos B, indicando que los SCS-Mph son esenciales para la presentación de antígenos particulado que se transmiten a través de la linfa.

30 Los linfocitos B se activan de forma más potente por los antígenos polivalentes que se presentan a los mismos sobre una superficie fija, en lugar de en solución. Aunque sin pretender quedar vinculados por teoría alguna, la presente invención sugiere un motivo por el cual muchos virus con envoltura (tales como VSV) estimulan potentes respuestas de anticuerpos neutralizantes a su glucoproteína de la envoltura, la proteína antigénica se presenta a una densidad muy elevada sobre la superficie de las partículas víricas, y las partículas víricas se presentan a los linfocitos B de una manera relativamente inmóvil, *es decir*, unido a la membrana plasmática de los SCS-Mph. La presente invención abarca el reconocimiento de que los transportadores de vacuena que imitan las partículas víricas dirigiendo los SCS-Mph tras la inyección subcutánea y la presentación de antígenos polivalentes conformacionalmente intactos sobre su superficie puede estimular una potente respuesta de linfocitos B.

35 En algunas realizaciones, El direccionamiento de SCS-Mph se lleva a cabo por restos que se unen a CD169 (*es decir*, la sialoadhesina, CD11b (*ies decir*, CD11b/CD18, Mac-1, CR3 o integrina $\alpha M\beta 2$), y/o el receptor de la manosa (*es decir*, una lectina multivalente), proteínas que se expresan todas de forma prominente en SCS-Mph. Los ejemplos de dichos restos incluyen aquellos proporcionados en otra parte en el presente documento.

40 En algunas realizaciones, se puede llevar a cabo el direccionamiento de SCS-Mph mediante cualquier resto de direccionamiento que se une específicamente a cualquier entidad (por ejemplo, proteína, lípido, hidrato de carbono, molécula pequeña, etc.) que se expresa prominentemente y/o está presente en las DC (*es decir*, marcadores de SCS-Mph). Los marcadores de SCS-Mph ilustrativos incluyen, pero sin limitación, CD4 (L3T4, W3/25, T4); CD9 (p24, DRAP-1, MRP-1); CD11a (LFA-1 α , una cadena de la integrina αL ; CD11b (cadena de integrina αM , CR3, Mol, C3niR, Mac-1); CD11c (Integrina αX , p150, 95, AXb2); CDw12 (p90-120); CD13 (APN, gp150, EC 3.4.11.2); CD14 (LPS-R); CD15 (X-Hapteno, Lewis, X, SSEA-1, 3-FAL); CD15s (Sialil Lewis X); CD15u (3' sulfo Lewis X); CD15su (6 sulfo-sialil Lewis X); CD16a (FCRIIIA); CD16b (Fc γ RIIIb); CDw17 (Lactosil ceramida, LacCer); CD18 (Integrina $\beta 2$, subunidad β de CD11a,b,c); CD26 (DPP IV ectoeneima, proteína de unión ADA); CD29 (GPIIa plaquetaria, Integrina β -1, GP); CD31 (PECAM-1, Endocam); CD32 (FC γ RII); CD33 (gp67); CD35 (CR1, receptor de C3b/C4b); CD36 (GpIIIb, GPIV, PASIV); CD37 (gp52-40); CD38 (ADP-ribosil ciclasa, T10); CD39 (ATP deshidrogenasa, NTPdeshidrogenasa-1); CD40 (Bp50); CD43 (Sialoforina, Leucosialina); CD44 (EMCRII, H-CAM, Pgp-1); CD45 (LCA, T200, B220, Ly5); CD45RA; CD45RB; CD45RC; CD45RO (UCHL-1); CD46 (MCP); CD47 (gp42, IAP, OA3, Neurofilina); CD47R (MEM-133); CD48 (Blast-1, Hulym3, BCM-1, OX-45); CD49a (VLA-1 α , Integrina $\alpha 1$); CD49b

(VLA-2 α , gp1a, Integrina α 2); CD49c (VLA-3 α , Integrina α 3); CD49e (VLA-5 α , Integrina α 5); CD49f (VLA-6 α , Integrina α 6, gp1c); CD50 (ICAM-3); CD51 (Integrina α , VNR-a, Vitronectina-Ra); CD52 (CAMPATH-1, HE5); CD53 (OX-44); CD54 (ICAM-1); CD55 (DAF); CD58 (LFA-3); CD59 (1F5Ag, H19, Protectina, MACIF, MIRL, P-18); CD60a (GD3); CD60b (9-O-acetil GD3); CD61 (GP IIIa, Integrina β 3); CD62L (L-selectina, LAM-1, LECAM-1, MEL-14, Leu8, TQ1);
 5 CD63 (LIMP, MLA1, gp55, NGA, LAMP-3, ME491); CD64 (FcyRI); CD65 (Ceramide, VIM-2); CD65s (CD65 sialilado, VIM2); CD72 (Ly-19.2, Ly-32.2, Lyb-2); CD74 (Ii, cadena invariante); CD75 (Lactosamina enmascarada con sialo); CD75S (Lactosamina a2,6 sialilada); CD80 (B7, B7-1, BB1); CD81 (TA-PA-1); CD82 (4F9, C33, IA4, KAI1, R2); CD84 (p75, GR6); CD85a (ILT5, LIR2, HL9); CD85d (ILT4, LIR2, MIR10); CD85j (ILT2, LIR1, MIR7); CD85k (ILT3, LIR5, HM18); CD86 (B7-2/B70); CD87 (uPAR); CD88 (C5aR); CD89 (receptor de IgA Fc, Fc α R); CD91 (α 2M-R, LRP); CDw92 (p70); CDw93 (GR11); CD95 (APO-1, FAS, TNFRSF6); CD97 (BL-KDD/F12); CD98 (4F2, FRP-1, RL-388); CD99 (MIC2, E2); CD99R (CD99 Mab restringido); CD 100 (SEMA4D, CD101 (IGSF2, P126, V7); CD102 (ICAM-2); CD111 (PVRL1, HveC, PRR1, Nectin 1, HlgR); CD112 (HveB, PRR2, PVRL2, Nectin2); CD114 (CSF3R, G-CSRF, HG-CSRF); CD115 (c-fms, CSF-1R, M-CSFR); CD116 (GM-CSFR α); CDw119 (IFN γ R, IFN- γ RA); CD120a (TNFRI, p55); CD120b (TNFRII, p75, TNFR p80); CD121b (Tipo 2 IL-1R); CD 122 (IL2R β , CD 123 (IL-3R α); CD 124 (IL-4Ra); CD 127 (p90, IL-7R, IL-7Ra); CD128a (IL-8Ra, CXCR1, (Renombrado tentativamente como CD181));
 15 CD128b (IL-8Rb, CSCR2, (Renombrado tentativamente como CD182)); CD130 (gp130); CD131 (subunidad β común); CD132 (Común y cadena, IL-2R γ); CDw136 (MSP-R, RON, p158-ron); CDw137 (4-1BB, I LA); CD139; CD141 (Trombomodulina, Fetomodulina); CD147 (Basigin, EMMPRIN, M6, OX47); CD148 (HPTP- η , p260, DEP-1); CD155 (PVR); CD156a (CD156, ADAM8, MS2); CD156b (TACE, ADAM 17, cSVP); CDw156C (ADAM 10); CD157 (Mo5, BST-1); CD162 (PSGL-1); CD164 (MGC-24, MUC-24); CD165 (AD2, gp37); CD168 (RHAMM, IHABP, HMMR); CD169 (Sialoadhesina, Siglec-1); CD170 (Siglec 5); CD171 (L1CAM, NILE); CD172 (SIRP-1 α , MyD-1); CD172b (SIRP β); CD180 (RP105, Bgp95, Ly64); CD181 (CXCR1, (Anteriormente conocido como CD128a)); CD182 (CXCR2, (Anteriormente conocido como CD 128b)); CD184 (CXCR4, NPY3R); CD 191 (CCR1, CD 192 (CCR2, CD 195 (CCR5, CDw197 (CCR7 (era CDw197)); CDw198 (CCR8); CD204 (MSR); CD205 (DEC-25); CD206 (MMR);
 20 CD207 (Langerina); CDw210 (CK); CD213a (CK); CDw217 (CK); CD220 (Insulina R); CD221 (IGF 1 R); CD222 (M6P-R, IG-FII-R); CD224 (GGT); CD226 (DNAM-1, PTA1); CD230 (Proteína priónica (Prp)); CD232 (VESP-R); CD244 (2B4, P38, NAIL); CD245 (p220/240); CD256 (APRIL, TALL2, superfamilia TNF (ligando), miembro 13); CD257 (BLYS, TALL1, superfamilia TNF (ligando), miembro 13b); CD261 (TRAIL-R1, superfamilia TNF-R, miembro 10a); CD262 (TRAIL-R2, superfamilia TNF-R, miembro 10b); CD263 (TRAIL-R3, superfamilia TNF-R, miembro 10c); CD264 (TRAIL-R4, superfamilia TNF-R, miembro 10d); CD265 (TRANCE-R, superfamilia TNF-R, miembro 11a); CD277 (BT3.1, familia B7: Butirofilina 3); CD280 (TEM22, ENDO180); CD281 (TLR1, receptor 1 de tipo TOLL); CD282 (TLR2, receptor 2 de tipo TOLL); CD284 (TLR4, receptor 4 de tipo TOLL); CD295 (LEPR); CD298 (ATP1B3, Na K ATPasa, subunidad β 3); CD300a (CMRF-35H); CD300c (CMRF-35A); CD300e (CMRF-35L1); CD302 (DCL1); CD305 (LAIR1); CD312 (EMR2); CD315 (CD9P1); CD317 (BST2); CD321 (JAM1); CD322 (JAM2); CDw328 (Siglec7); CDw329 (Siglec9); CD68 (gp 110, Macrosialina); y/o el receptor de manosa; en el que los nombres relacionados en paréntesis representan nombres alternativos. Los ejemplos de dichos marcadores incluyen aquellos proporcionados en otra parte del presente documento.

En algunas realizaciones, se puede llevar a cabo el direccionamiento de SCS-Mph mediante cualquier resto de direccionamiento que se une específicamente a cualquier entidad (por ejemplo, proteína, lípido, hidrato de carbono, molécula pequeña, etc.) este se expresa prominentemente y/o está presente en macrófagos tras la activación (es decir, marcador de SCS-Mph activado, Los marcadores de SCS-Mph activados ilustrativos incluyen, pero sin limitación, CD1a (R4, T6, HTA-1); CD1b (R1); CD1c (M241, R7); CD44R (CD44v, CD44v9); CD49d (VLA-4a, integrina α 4); CD69 (AIM, EA 1, MLR3, gp34/28, VEA); CD105 (Endoglina); CD142 (Factor tisular, Tromboplastina, F3); CD143 (ACE, Peptidil dipeptidasa A, Quinasa 11); CD153 (CD3OL, TNSF8); CD163 (M130, GHI/61, RM3/1); CD166 (ALCAM, KG-CAM, SC-1, BEN, DM-GRASP); CD227 (MUC1, PUM, PEM, EMA); CD253 (TRAIL, superfamilia TNF (ligando), miembro 10); CD273 (B7DC, PDL2); CD274 (B7H1,PDL1); CD275 (B7H2, ICOSL); CD276 (B7H3); CD297 (ART4, ADP-ribosiltransferasa 4; y glucoproteína del grupo sanguíneo Dombrock; en el que los nombres relacionados en paréntesis representan nombres alternativos. Los ejemplos de dichos marcadores incluyen aquellos proporcionados en otra parte del presente documento.

Restos de direccionamiento de linfocitos B

En algunas realizaciones, Se puede llevar a cabo el direccionamiento de linfocitos B mediante restos que se unen a los receptores del complemento, CR1 (es decir, CD35) o CR2 (es decir, CD21), proteínas que se expresan en linfocitos B así como FDC. En algunas realizaciones, el direccionamiento de linfocitos B puede llevarse a cabo mediante marcadores de linfocitos B tales como CD19, CD20, y/o CD22. En algunas realizaciones, el direccionamiento de linfocitos B puede llevarse a cabo mediante marcadores de linfocitos B tales como CD40, CD52, CD80, CXCR5, VLA-4, MHC de clase II, IgM o IgD superficial, APRIL, y/o BAFF-R. La presente invención abarca el reconocimiento de que el direccionamiento simultáneo de linfocitos B por restos específicos para los receptores del complemento y las moléculas asociadas a APC refuerza las respuestas humorales.

En algunas realizaciones, El direccionamiento de linfocitos B puede llevarse a cabo mediante cualquier resto de direccionamiento que se una específicamente a cualquier entidad (por ejemplo, proteína, lípido, hidrato de carbono, molécula pequeña, etc.) que se expresa prominentemente y/o está presente en linfocitos B (es decir, un marcador de linfocitos B). Los marcadores de linfocitos B ilustrativos incluyen, pero sin limitación, CD1c (M241, R7); CD1d (R3);

CD2 (E-rosette R, T11, LFA-2); CD5 (T1, Tp67, Leu-1, Ly-1); CD6 (T12); CD9 (p24, DRAP-1, MRP-1); CD11a (LFA-1 α , una cadena de la integrina α L; CD11b (cadena de integrina α M, CR3, Mo1, C3niR, Mac-1); CD11c (Integrina α X, P150, 95, AXb2); CDw17 (Lactosil ceramida, LacCer); CD18 (Integrina β 2, CD11a, b, subunidad c β); CD19 (B4); CD20 (B1, Bp35); CD21 (CR2, EBV-R, C3dR); CD22 (BL-CAM, Lyb8, Siglec-2); CD23 (FceRII, B6, BLAST-2, Leu-20); CD24 (BBA-1, HSA); CD25 (antígeno Tac, IL-2R α , p55); CD26 (DPP IV ectoeneima, proteína de unión ADA); CD27 (T14, S152); CD29 (GPIIa plaquetaria, Integrina β -1, GP); CD31 (PECAM-1, Endocam); CD32 (FCyRII); CD35 (CR1, receptor de C3b/C4b); CD37 (gp52-40); CD38 (ADP-ribosil ciclasa, T10); CD39 (ATP deshidrogenasa, NTP deshidrogenasa-1); CD40 (Bp50); CD44 (ECMR1I, H-CAM, Pgp-1); CD45 (LCA, T200, B220, Ly5); CD45RA; CD45RB; CD45RC; CD45RO (UCHL-1); CD46 (MCP); CD47 (gp42, IAP, OA3, Neurofilina); CD47R (MEM-133); CD48 (Blast-1, Hulym3, BCM-1, OX-45); CD49b (VLA-2 α , gpl, Integrina α 2); CD49c (VLA-3a, integrina α 3); CD49d (VLA-4a, integrina α 4); CD50 (ICAM-3); CD52 (CAMPATH-1, HES); CD53 (OX-44); CD54 (ICAM-1); CD55 (DAF); CD58 (LFA-3); CD60a (GD3); CD62L (L-selectina, LAM-1, LECAM-1, MEL-14, Leu8, TQ1); CD72 (Ly-19.2, Ly-32.2, Lyb-2); CD73 (Ecto-5'-nucleotidasa); CD74 (li, cadena invariante); CD75 (Lactosamina enmascarada con sialo); CD75S (α 2, Lactosamina 6 sialilada); CD77 (antígeno Pk, BLA, CTH/Gb3); CD79a (Iga, MB1); CD79b (Igb, B29); CD80; CD81 (TAPA-1); CD82 (4F9, C33, IA4, KAI1, R2); CD83 (HB15); CD84 (P75, GR6); CD85j (ILT2, LIR1, MIR7); CDw92 (p70); CD95 (APO-1, FAS, TNFRSF6); CD98 (4F2, FRP-1, RL-388); CD99 (MIC2, E2); CD100 (SEMA4D); CD102 (ICAM-2); CD108 (SEMA7A, antígeno del grupo sanguíneo JMH); CDw119 (IFNyR, IFNyRa); CD120a (TNFR1, p55); CD120b (TNFR2, p75, TNFR p80); CD121b (Tipo 2 IL-1R); CD122 (IL2R β); CD124 (IL-4R α); CD130 (gp130); CD132 (Común γ cadena, IL-2R γ); CDw137 (4-1BB, I LA); CD139; CD147 (Basigin, EMMPRIN, M6, OX47); CD150 (SLAM, IPO-3); CD162 (PSGL-1); CD164 (MGC-24, MUC-24); CD166 (ALCAM, KG-CAM, SC-1, BEN, DM-GRASP); CD167a (DDR1, trkE, cak); CD171 (L1CMA, NILE); CD175s (Sialil-Tn (S-Tn)); CD180 (RP105, Bgp95, Ly64); CD184 (CXCR4, NPY3R); CD 185 (CXCR5, CD 192 (CCR2, CD 196 (CCR6, CD 197 (CCR7 (era CDw197)); CDw197 (CCR7, EBI1, BLR2); CD200 (OX2); CD205 (DEC-205); CDw210 (CK); CD213a (CK); CDw217 (CK); CDw218a (IL18R α); CDw218b (IL18R β); CD220 (Insulina R); CD221 (IGF1 R); CD222 (M6P-R, IG-FII-R); CD224 (GGT); CD225 (Leu13); CD226 (DNAM-1, PTA1); CD227 (MUC1, PUM, PEM, EMA); CD229 (Ly9); CD230 (Proteína priónica (Prp)); CD232 (VESP-R); CD245 (p220/240); CD247 (cadena Zeta de CD3); CD261 (TRAIL-R1, superfamilia TNF-R, miembro 10a); CD262 (TRAIL-R2, superfamilia TNF-R, miembro 10b); CD263 (TRAIL-R3, superfamilia TNF-R, miembro 10c); CD264 (TRAIL-R4, superfamilia TNF-R, miembro 10d); CD265 (TRANCE-R, superfamilia TNF-R, miembro 11a); CD267 (TACI, superfamilia TNF-R, miembro 13B); CD268 (BAF-FR, superfamilia TNF-R, miembro 13C); CD269 (BCMA, superfamilia TNF-R, miembro 16); CD275 (B7H2, ICOSL); CD277 (familia BT3.1.B7: Butirofilina 3); CD295 (LEPR); CD298 (subunidad β 3 de la ATP1B3 Na K ATPasa); CD300a (CMRF-35H); CD300c (CMRF-35A); CD305 (LAIR1); CD307 (IRTA2); CD315 (CD9P1); CD316 (EW12); CD317 (BST2); CD319 (CRACC, SLAMF7); CD321 (JAM1); CD322 (JAM2); CDw327 (Siglec6, CD33L); CD68 (gp 100, Macrosialina); CXCR5; VLA-4; MHC de clase II; IgM superficial; IgD superficial; APRL; y/o BAFF-R; en el que los nombres relacionados en paréntesis representan nombres alternativos. Los ejemplos de marcadores incluyen aquellos proporcionados en otra parte en el presente documento.

En algunas realizaciones, El direccionamiento de linfocitos B puede llevarse a cabo mediante cualquier resto de direccionamiento que se una específicamente a cualquier entidad (por ejemplo, proteína, lípido, hidrato de carbono, molécula pequeña, etc.) que se expresa prominentemente y/o está presente en linfocitos B tras la activación (es decir, un marcador de linfocitos B activados). Los marcadores de Linfocitos B activados ilustrativos incluyen, pero sin limitación, CD1a (R4, T6, HTA-1); CD1b (R1); CD15s (Sialil Lewis X); CD15u (3' sulfo Lewis X); CD15su (6 sulfo-sialil Lewis X); CD30 (Ber-H2, Ki-1); CD69 (AIM, EA 1, MLR3, gp34/28, VEA); CD70 (Ki-24, ligando de CD27); CD80 (B7, B7-1, BB1); CD86 (B7-2/B70); CD97 (BL-KDD/F12); CD125 (IL-5R α); CD126 (IL-6R α); CD138 (Syndecan-1, Proteoglicano de heparán sulfato); CD 152 (CTLA-4, CD252 (OX40L, Superfamilia TNF (ligando), miembro 4); CD253 (TRAIL, Superfamilia TNF (ligando), miembro 10); CD279 (PD1); CD289 (TLR9, receptor 9 de tipo TOLL); y CD312 (EMR2); en el que los nombres relacionados en paréntesis representan nombres alternativos. Los ejemplos de marcadores incluyen aquellos proporcionados en otra parte en el presente documento.

50 Células dendríticas foliculares

Los linfocitos B que detectan inicialmente un antígeno anteriormente desconocido expresan normalmente un receptor de linfocitos B (BCR, es decir, un anticuerpo con un dominio transmembrana) con afinidad de unión subóptima por este antígeno. Sin embargo, los linfocitos B pueden aumentar en algunos órdenes de magnitud la afinidad de los anticuerpos que hacen cuando se introducen en una reacción del centro germinal (GC). Este acontecimiento, que dura normalmente algunas semanas, depende de las FDC que se acumulan, retienen y presentan material antigénico a los linfocitos B activados. Los linfocitos B, a la vez que proliferan vigorosamente, mutan repetidamente las secuencias genómicas que codifican el sitio de unión al antígeno de su anticuerpo y experimentan la recombinación de cambio de clase para formar anticuerpos secretados de elevada afinidad, siendo la mayoría del isotipo IgG. Las reacciones de GC estimulan también la generación de linfocitos B con memoria y de células plasmáticas de vida prolongada que mantienen títulos de anticuerpo muy protectores, a menudo durante muchos años. Los transportadores de vacunas que se dirigen a las FDC tras la inyección subcutánea y que se retienen en la superficie de las FDC durante largos periodos de tiempo se proveen para reforzar las reacciones de GC en respuesta a la vacunación y aumentan la afinidad y la longevidad de las respuestas inmunitarias humorales deseadas.

En algunas realizaciones, se puede llevar a cabo el direccionamiento de FDC mediante restos que se unen a los receptores del complemento, CR1 (es decir, CD35) o CR2 (es decir, CD21), proteínas que se expresan en FDC así como en linfocitos B. Los ejemplos de restos incluyen aquellos proporcionados en otra parte en el presente documento.

5

Nanotransportadores de vacunas que comprenden múltiples restos de direccionamiento

Las reacciones de GC y la supervivencia de linfocitos B no requieren solo FDC, sino que también son dependientes de la ayuda proporcionada por los linfocitos T CD4. La ayuda se proporciona más eficazmente cuando un linfocito T CD4 se estimula en primer lugar por una DC que presenta un péptido análogo en las MHC de clase II (pMHC) para conseguir un fenotipo (T_{FH}) auxiliar folicular. Los linfocitos T_{FH} generados recientemente migran a continuación hacia el folículo B y proporcionan ayuda a aquellos linfocitos B que los presentan con el mismo complejo pMHC. Para esto, los linfocitos B adquieren en primer lugar material antigénico (por ejemplo, virus o vacunas de tipo virus), internalizan y procesan este it (*es decir*, el extracto peptídico que se carga en las MHC de clase II), y a continuación presentan el pMHC a un linfocito T_{FH} .

10

15

De este modo, la presente invención abarca el reconocimiento de que una vacuna que estimula la inmunidad humoral óptima puede combinar algunas características y componentes (Figura 1): a) material antigénico para los linfocitos T CD4 que se dirige y presenta por las DC; (b) antígenos superficiales de elevada densidad que pueden presentarse en su forma nativa por los SCS-Mph a linfocitos B foliculares específicos de antígenos; (c) la capacidad de adquirirse y procesarse por los linfocitos B foliculares para la presentación a linfocitos T_{FH} (la presente invención abarca el reconocimiento de que los linfocitos B adquieren e internalizan fácilmente la materia particulada de los SCS-Mph); (d) la capacidad de alcanzar las FDC y de retenerse en las FDC en una forma intacta y durante largos periodos de tiempo; y (e) la actividad adyuvante vuelve a las APC completamente inmunógenas y evita o supera la tolerancia.

20

25

En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende al menos un resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, todos los restos de direccionamiento de un nanotransportador de vacunas son idénticos entre sí. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende un número de diferentes tipos de restos de direccionamiento. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende múltiples restos de direccionamiento individuales, todos los cuales son idénticos entre sí. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende exactamente un tipo de resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende exactamente dos tipos distintos de restos de direccionamiento. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende más de dos tipos distintos de restos de direccionamiento.

30

35

En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende un único tipo de resto de direccionamiento que dirige la administración del nanotransportador de vacunas a un único tipo de célula (por ejemplo, administración solo a SCS-Mph). En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas comprenden un único tipo de resto de direccionamiento que dirige la administración del nanotransportador de vacunas a múltiples tipos de células (por ejemplo, administración a SCS-Mph y FDC). En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende dos tipos de restos de direccionamiento, en el que el primer tipo de resto de direccionamiento dirige la administración del nanotransportador de vacunas a un tipo de célula, y el segundo tipo de resto de direccionamiento dirige la administración del nanotransportador de vacunas a un segundo tipo de célula. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende más de dos tipo distintos de restos de direccionamiento, en el que uno o más tipos de restos de direccionamiento dirigen la administración del nanotransportador de vacunas a un tipo de célula, y uno o más tipos de restos de direccionamiento dirigen la administración del nanotransportador de vacunas a un segundo tipo de célula. Para dar, pero a modo de ejemplo, un nanotransportador de vacunas puede comprender dos tipos de restos de direccionamiento, en el que el primer tipo de resto de direccionamiento dirige la administración del nanotransportador de vacunas a las DC, y el segundo tipo de resto de direccionamiento dirige la administración del nanotransportador de vacunas a los SCS-Mph.

40

45

50

En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende al menos un tipo de resto de direccionamiento que está asociado con la superficie exterior del nanotransportador de vacunas. En algunas realizaciones, la asociación es covalente. En algunas realizaciones, la asociación covalente está mediada por uno o más enlazadores. En algunas realizaciones, la asociación es no covalente. En algunas realizaciones, la asociación no covalente está mediada por interacciones de carga, interacciones de afinidad, coordinación metálica, adsorción física, interacciones hospedador-huésped, interacciones hidrófobas, interacciones de apilado de TT, interacciones de enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electroestáticas, interacciones dipolo-dipolo, y/o sus combinaciones.

55

60

En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende una membrana lipídica (por ejemplo, una bicapa lipídica, una monocapa lipídica, etc.), en el que al menos un tipo de resto de direccionamiento está asociado con la membrana lipídica. En algunas realizaciones, al menos un resto de direccionamiento está incluido en la membrana lipídica. En algunas realizaciones, al menos un resto de direccionamiento está incluido en la luz de una bicapa lipídica. En algunas realizaciones, al menos un tipo de resto de direccionamiento puede estar localizado en

65

múltiples localizaciones de un nanotransportador de vacunas. Por ejemplo, un primer resto de direccionamiento puede estar incluido en una membrana lipídica, y un segundo agente inmunoestimulador puede estar asociado con la superficie exterior de un nanotransportador de vacunas. Para dar otro ejemplo, un primer resto de direccionamiento y un segundo resto de direccionamientos pueden estar asociados con la superficie exterior de un nanotransportador de vacunas.

Agentes inmunoestimuladores

Como se ha descrito anteriormente, los nanotransportadores de vacunas pueden transportar uno o más agentes inmunoestimuladores que pueden ayudar a estimular respuestas inmunitarias. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende un único tipo de agente inmunoestimulador que estimula linfocitos B y linfocitos T. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende dos tipos de agentes inmunoestimuladores, en el que el primer tipo de agente inmunoestimulador estimula linfocitos B, y el segundo tipo de agente inmunoestimulador estimula linfocitos T. En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas comprende más de dos tipos distintos de agentes inmunoestimuladores, en el que uno o más tipos de agentes inmunoestimuladores estimulan linfocitos B, y uno o más tipos de agentes inmunoestimuladores estimulan linfocitos T. Véase la sección anterior para una descripción más detallada de los agentes inmunoestimuladores que se pueden usar de acuerdo con la presente invención.

Ensayos para la activación de linfocitos B

En algunas realizaciones, se pueden utilizar diversos ensayos a fin de determinar si se ha estimulado una respuesta inmunitaria en un linfocito B o en un grupo de linfocitos B (*es decir*, si un linfocito B o un grupo de linfocitos B se ha llegado a "activar"). En algunas realizaciones, la estimulación de una respuesta inmunitaria en linfocitos B puede determinarse midiendo los títulos de anticuerpos. En general, "título de anticuerpo" se refiere a la capacidad de los anticuerpos de unirse y neutralizar antígenos a diluciones concretas. Por ejemplo, un título elevado de anticuerpos se refiere a la capacidad de los anticuerpos de unirse y neutralizar antígenos incluso a diluciones elevadas. En algunas realizaciones, se dice que se va a estimular una respuesta inmunitaria en linfocitos B si se mide que los títulos de anticuerpos son positivos a diluciones aproximadamente 5 veces mayores, al menos aproximadamente 10 veces mayores, al menos aproximadamente 20 veces mayores, al menos aproximadamente 50 veces mayores, al menos aproximadamente 100 veces mayores, al menos aproximadamente 500 veces mayores, al menos aproximadamente 1000 veces mayores, o más de aproximadamente 1000 veces mayores que en individuos no inmunizados o en suero previamente inmunizado.

En algunas realizaciones, la estimulación de una respuesta inmunitaria en linfocitos B puede determinarse midiendo la afinidad del anticuerpo. En particular, se dice que se va a estimular una respuesta inmunitaria en linfocitos B si un anticuerpo tiene una constante de disociación en equilibrio (K_d) menor de 10^{-7} M, menor de 10^{-8} M, menor de 10^{-9} M, menor de 10^{-10} M, menor de 10^{-11} M, menor de 10^{-12} M, o menos.

En algunas realizaciones, se dice que se va a estimular una respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos T en linfocitos B la se ha producido la recombinación de cambio de clase. En particular, un cambio del isotipo IgM a un isotipo IgG o a IgA o a una mezcla de estos isotipos es indicativo de una respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos T en linfocitos B.

En algunas realizaciones, se determina una respuesta inmunitaria en linfocitos B midiendo la maduración por afinidad de los anticuerpos específicos del antígeno. La maduración por afinidad se produce durante la reacción del centro germinal por lo cual los linfocitos B activados mutan repetidamente a una región del gen de la inmunoglobulina na que codifica la región de unión al antígeno. Se permite preferentemente que los linfocitos B productores de anticuerpos mutados que tienen una mayor afinidad por el antígeno sobrevivan y proliferen. De este modo, con el tiempo, los anticuerpos hechos por linfocitos B en los GC adquieren afinidades incrementalmente mayores. En algunas realizaciones, la lectura de este proceso es la presencia de un título elevado de anticuerpos (*por ejemplo*, anticuerpos de IgG de elevada afinidad que se unen y neutralizan antígenos incluso a elevadas diluciones).

En algunas realizaciones, se dice que se va a estimular una respuesta inmunitaria en linfocitos B si se han formado linfocitos B con memoria y/o células plasmáticas de vida prolongada que pueden producir grandes cantidades de anticuerpos de elevada afinidad durante periodos prolongados de tiempo. En algunas realizaciones, los títulos de anticuerpos se miden después de diferentes intervalos de tiempo (por ejemplo, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años, 15 años, 20 años, 25 años, o más) tras la vacunación a fin de probar la presencia de linfocitos B con memoria y/o células plasmáticas de vida prolongada que pueden producir grandes cantidades de anticuerpos de elevada afinidad durante periodos prolongados de tiempo. En algunas realizaciones, se dice que los linfocitos B con memoria y/o las células plasmáticas de vida prolongada que pueden producir grandes cantidades de anticuerpos de elevada afinidad durante periodos prolongados de tiempo están presentes midiendo las respuestas humorales (por ejemplo, si las respuestas humorales son marcadamente más rápidas y dan como resultado títulos más elevados después de una última vacunación de refuerzo que durante la sensibilización inicial).

En algunas realizaciones, se dice que va a estimularse una respuesta inmunitaria en los linfocitos B se produce una vigorosa reacción en el centro germinal. En algunas realizaciones, se puede evaluar una vigorosa reacción en el centro germinal visualmente llevando a cabo experimentos de histología. En algunas realizaciones, se puede evaluar una reacción vigorosa en el centro germinal llevando a cabo la inmunohistoquímica de los tejidos linfoides que contienen antígenos (por ejemplo, ganglios linfáticos que drenan vacunas,, bazo, etc.). En algunas realizaciones, la inmunohistoquímica es seguida por citometría de flujo.

En algunas realizaciones, la estimulación de una respuesta inmunitaria en linfocitos B puede determinarse identificando isotipos de anticuerpos (por ejemplo, IgG, IgA, IgE, IgM). En determinadas realizaciones, la producción de anticuerpos de isotipo IgG por linfocitos B es una respuesta inmunitaria deseable en un linfocito B.

En algunas realizaciones, se determina una respuesta inmunitaria en linfocitos B analizando la función del anticuerpo en ensayos de neutralización. En particular, la capacidad de un microorganismo (por ejemplo, virus, bacteria, hongo, por protozoos, parásito, etc.) para infectar una línea de células susceptible *in vitro* en ausencia de suero se compara con las condiciones cuando se añaden las diferentes diluciones de suero inmunitario y no inmunitario al medio de cultivo en el que se hacen crecer las células. En determinadas realizaciones, se dice que se va a estimular una respuesta inmunitaria en un linfocito B si se neutraliza la infección de un microorganismo a una dilución de aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:500, aproximadamente 1:1000, aproximadamente 1:5000, aproximadamente 1:10.000, o menos.

En algunas realizaciones, se puede determinar la eficacia de las vacunas en modelos animales infectando grupos de ratones inmunizados y no inmunizados (por ejemplo, 3 o más semanas después de la vacunación) con una dosis de un microorganismo que sea normalmente letal. La magnitud y la supervivencia de ambos grupos se vigila y se representan gráficamente normalmente unas curvas de Kaplan-Meier. Para evaluar si la supervivencia potenciada es debida a las respuestas de los linfocitos B, el suero de ratones inmunes se puede transferir como una "vacuna pasiva" para evaluar la protección de ratones no inmunes de la infección letal.

Una persona normalmente experta en la materia reconocerá que los ensayos descritos anteriormente son solo métodos ilustrativos que podrían utilizarse a fin de determinar si se ha producido la activación de los linfocitos B. Cualquier ensayo conocido por una persona experta en la materia podría utilizarse para determinar si se ha producido la activación de linfocitos B y se encuentra comprendida en el alcance de la presente invención. Los ensayos descritos en el presente documento así como los ensayos adicionales que podrían utilizarse para determinar si se ha producido la activación de linfocitos B se describen en Current Protocols in Immunology (John Wiley & Sons, Hoboken, NY, 2007).

Nanotransportadores de vacunas

En general, un nanotransportador de vacunas es una entidad que comprende, por ejemplo, al menos un agente inmunomodulador que es capaz de estimular una respuesta inmunitaria en linfocitos B y/o en linfocitos T. En algunas realizaciones, los nanotransportadores son biodegradables y biocompatibles. En general, una sustancia biocompatible es no tóxica para las células. En algunas realizaciones, se considera que una sustancia es biocompatible si su adición a células da como resultado menos de un determinado umbral de destrucción celular (por ejemplo, menos del 50 %, 20 %, 10 %, 5 %, o menos de destrucción celular). En algunas realizaciones, se considera que una sustancia es biocompatible si su adición a células no induce efectos adversos. En general, una sustancia biodegradable es aquella que experimenta rotura en condiciones fisiológicas durante el curso de un periodo de tiempo terapéuticamente relevante (por ejemplo, semanas, meses, o años). En algunas realizaciones, una sustancia biodegradable es una sustancia que se descompone mediante maquinaria celular. En algunas realizaciones, una sustancia biodegradable es una sustancia que se descompone mediante procesos químicos. En algunas realizaciones, un nanotransportador es una sustancia que es biocompatible y biodegradable. En algunas realizaciones, un nanotransportador es una sustancia que es biocompatible, pero no biodegradable. En algunas realizaciones, un nanotransportador es una sustancia que es biodegradable, pero no biocompatible.

En algunas realizaciones, los nanotransportadores tienen un diámetro de aproximadamente 500 nm. En algunas realizaciones, los nanotransportadores tienen un diámetro de aproximadamente 450 nm. En algunas realizaciones, los nanotransportadores tienen un diámetro de aproximadamente 400 nm. En algunas realizaciones, los nanotransportadores tienen un diámetro de aproximadamente 350 nm. En algunas realizaciones, los nanotransportadores tienen un diámetro de aproximadamente 300 nm. En algunas realizaciones, los nanotransportadores tienen un diámetro de aproximadamente 275 nm. En algunas realizaciones, los nanotransportadores tienen un diámetro de aproximadamente 250 nm. En algunas realizaciones, los nanotransportadores tienen un diámetro de aproximadamente 225 nm. En algunas realizaciones, los nanotransportadores tienen un diámetro de aproximadamente 200 nm. En algunas realizaciones, los nanotransportadores tienen un diámetro de aproximadamente 175 nm. En algunas realizaciones, los nanotransportadores tienen un diámetro de aproximadamente 150 nm. En algunas realizaciones, los nanotransportadores tienen un diámetro de aproximadamente 125 nm. En algunas realizaciones, los nanotransportadores tienen un diámetro de aproximadamente 100 nm. En algunas realizaciones, los nanotransportadores tienen un diámetro de aproximadamente 75 nm. En algunas realizaciones, los

nanotransportadores tienen un diámetro de aproximadamente 50 nm.

En determinadas realizaciones, los nanotransportadores son suficientemente pequeños para evitar el aclaramiento de los nanotransportadores del torrente sanguíneo por el hígado (por ejemplo, los nanotransportadores tienen diámetros de menos de 1000 nm). En general, las características fisicoquímicas de los nanotransportadores deberían permitir a un nanotransportador circular más tiempo en plasma disminuyendo la excreción renal y el aclaramiento hepático.

Es a menudo deseable utilizar una población de nanotransportadores que sea relativamente uniforme en términos de tamaño, forma, y/o composición de tal manera que cada nanotransportador tenga propiedades similares. Por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % de los nanotransportadores pueden tener un diámetro de mayores dimensiones que se encuentra comprendido en el 5 %, 10 %, o 20 % del diámetro promedio o de dimensiones mayores. En algunas realizaciones, una población de nanotransportadores puede ser heterogénea con respecto al tamaño, forma, y/o composición.

Se pueden usar varios nanotransportadores diferentes de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, los nanotransportadores son esferas o esferoides. En algunas realizaciones, los nanotransportadores son esferas o esferoides. En algunas realizaciones, los nanotransportadores tienen forma plana o de placa. En algunas realizaciones, los nanotransportadores son cubos o cuboides. En algunas realizaciones, los nanotransportadores son óvalos o elipses. En algunas realizaciones, los nanotransportadores son cilindros, conos, o pirámides.

Los nanotransportadores pueden ser huecos y pueden comprender una o más capas. En algunas realizaciones, cada capa tiene una única composición y unas únicas propiedades con respecto a las otras capa(s). Para dar, pero a modo de ejemplo, nanotransportadores que tienen una estructura de núcleo/envoltura, en el que el núcleo es una capa (por ejemplo, un núcleo polimérico) y la envoltura es una segunda capa (por ejemplo, una bicapa o monocapa lipídica). Los nanotransportadores pueden comprender una pluralidad de diferentes capas. En algunas realizaciones, una capa puede estar sustancialmente reticulada, una segunda capa no está sustancialmente reticulada, y así sucesivamente. En algunas realizaciones, una, unas pocas, o todas las diferentes capas pueden comprender uno o más agentes inmunomoduladores, restos de direccionamiento, agentes inmunoestimuladores, y/o sus combinaciones. En algunas realizaciones, una capa comprende un agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, y/o un agente inmunoestimulador, una segunda capa no comprende un agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, y/o un agente inmunoestimulador, y así sucesivamente. En algunas realizaciones, cada capa individual comprende un agente inmunomodulador diferente, un resto de direccionamiento, una agente inmunoestimulador, y/o sus combinaciones.

Nanotransportadores de vacunas lipídicas

En algunas realizaciones, los nanotransportadores pueden comprender opcionalmente uno o más lípidos. En algunas realizaciones, los nanotransportadores pueden comprender una bicapa lipídica. En algunas realizaciones, un nanotransportador comprende una monocapa lipídica. En algunas realizaciones, un nanotransportador puede comprender un núcleo de una matriz polimérica rodeado por una capa lipídica (por ejemplo, una bicapa lipídica, una monocapa lipídica, etc.).

En algunas realizaciones, los nanotransportadores pueden comprender una bicapa lipídica orientada de tal manera que el interior y el exterior del nanotransportador son hidrófilos, y la luz de la bicapa lipídica es hidrófoba. Los ejemplos comparativos de transportadores de vacunas que comprenden las bicapas lipídicas se describen en el Ejemplo 2 y se muestran en las Figuras 3-8. En algunas realizaciones, los agentes inmunomoduladores hidrófobos, restos de direccionamiento, y/o los agentes inmunoestimuladores pueden estar asociados con (por ejemplo, incluidos en) la luz de la bicapa lipídica. En algunas realizaciones, los agentes inmunomoduladores hidrófilos, restos de direccionamiento, y/o los agentes inmunoestimuladores pueden estar asociados con (por ejemplo, asociados de forma covalente o no covalente, encapsularse en el interior, etc.) el interior y/o el exterior del nanotransportador. En algunas realizaciones, los agentes inmunomoduladores hidrófilos, restos de direccionamiento, y/o los agentes inmunoestimuladores pueden estar asociados con (por ejemplo, asociados de forma covalente o no covalente, encapsularse en el interior, etc.) la superficie interior y/o exterior de la bicapa lipídica. En algunas realizaciones, la superficie hidrófila interior de la bicapa lipídica está asociada con la entidad anfífilica. En algunas realizaciones, la entidad anfífilica está orientada de tal manera que el extremo hidrófilo de la entidad anfífilica está asociado con la superficie interior de la bicapa lipídica, y el extremo hidrófobo de la entidad anfífilica está orientado hacia el interior del nanotransportador, produciendo un entorno hidrófobo en el interior del nanotransportador.

En algunas realizaciones, los nanotransportadores pueden comprender una monocapa lipídica orientada de tal manera que el interior de los nanotransportadores es hidrófobo, y el exterior del nanotransportador es hidrófilo. En el Ejemplo 2 se describen ejemplos comparativos de nanotransportadores de vacunas que comprenden monocapas lipídicas y se muestran en las Figuras 9 y 10. En algunas realizaciones, los agentes inmunomoduladores hidrófobos, restos de direccionamiento, y/o los agentes inmunoestimuladores pueden estar asociados con (por ejemplo, asociados de forma covalente o no covalente con, encapsularse en el interior, etc.) el interior del nanotransportador

- y/o la superficie interior de la monocapa lipídica. En algunas realizaciones, los agentes inmunomoduladores hidrófilos, restos de direccionamiento, y/o los agentes inmunoestimuladores pueden estar asociados con (por ejemplo, asociados de forma covalente o no covalente, encapsularse en el interior, etc.) el exterior del nanotransportador y/o la superficie exterior de la monocapa lipídica. En algunas realizaciones, la superficie hidrófila interior la superficie hidrófoba de la bicapa lipídica está asociada con la entidad anfifílica. En algunas realizaciones, la entidad anfifílica está orientada de tal manera que el extremo hidrófobo de la entidad anfifílica está asociado con la superficie interior de la bicapa lipídica, y el extremo hidrófilo de la entidad anfifílica está orientado hacia el interior del nanotransportador, produciendo un entorno hidrófilo en el interior del nanotransportador.
- 5
- 10 En algunas realizaciones, un nanotransportador puede comprender una o más nanopartículas asociadas con la superficie exterior del nanotransportador. Los ejemplos comparativos de transportadores de vacunas que comprenden nanopartículas asociadas con la superficie exterior del nanotransportador se describen en el Ejemplo 2 y se muestran en las Figuras 4, 6 y 8.
- 15 En algunas realizaciones, los lípidos son aceites. En general, cualquier aceite conocido en la técnica puede estar incluido en los nanotransportadores. En algunas realizaciones, un aceite puede comprender uno o más grupos de ácidos grasos o sus sales. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede comprender hidrocarburos digeribles, de cadena larga (por ejemplo, C₈-C₅₀), sustituidos o no sustituidos. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser un ácido graso C₁₀-C₂₀ o una de sus sales. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser un ácido graso C₁₅-C₂₀ o una de sus sales. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser un ácido graso C₁₅-C₂₅ o una de sus sales. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede estar insaturado. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede estar monoinsaturado. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede estar poliinsaturado. En algunas realizaciones, un doble enlace de un grupo de ácido graso insaturado puede estar en la conformación *cis*. En algunas realizaciones, un doble enlace de un ácido graso insaturado puede estar en la conformación *trans*.
- 20
- 25

En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser uno o más de ácido butírico, caproico, caprílico, cáprico, laúrico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behénico, o lignocérico. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser uno o más de ácido palmitoleico, oleico, vacénico, linoleico, alfa-linolénico, gamma-linoleico, araquidónico, gadoleico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico, o ácido erúcido.

30

En algunas realizaciones, el agente es un triglicérido líquido.

Los aceites adecuados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen, pero sin limitación, aceite de almendras, aceite de almendras de albaricoque, aguacate, babasú, bergamota, semillas de grosella negra, borraja, enebro de miera, camomila, canola, alcaravea, carnaúba, ricino, canela, manteca de cacao, coco, hígado de bacalao, café, maíz, semillas de algodón, emú, eucalipto, onagra, pescado, semillas de lino, geraniol, calabaza, pepitas de uva, avellanas, hisopo, jojoba, nuez de kukui, lavandina, lavanda, limón, litsea cubeba, nuez de macadamia, malva, semillas de mango, semillas de hierba de la pradera, visón, nuez moscada, de oliva, naranja, de reloj anaranjado, palma, nuez de palma, nuez de melocotón, cacahuete, semillas de amapola, semillas de calabaza, colza, salvado de arroz, romero, cártamo, madera de sándalo, camelia sasquana, aceite especiado, espino cerval, sésamo, manteca de karité, silicona, soja, girasol, árbol del té, cardo, camelia, vetiver, nuez, y aceites de gérmenes de trigo, y sus combinaciones. Los aceites adecuados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen, pero sin limitación, estearato de butilo, triglicérido caprílico, triglicérido cáprico, ciclometicona, sebacato de dietilo, dimeticona 360, miristato de isopropilo, aceite mineral, octildodecanol, alcohol oleílico, aceite de silicona, y sus combinaciones.

35

40

45

En algunas realizaciones, un lípido es una hormona (por ejemplo, estrógeno, testosterona), esteroide (por ejemplo, colesterol, ácido biliar), vitamina (por ejemplo, vitamina E), fosfolípido (por ejemplo, fosfatidil colina), esfingolípido (por ejemplo, ceramidas), o lipoproteína (por ejemplo, apolipoproteína).

50

Nanotransportadores que comprende una matriz polimérica

- Los nanotransportadores comprenden uno o más polímeros. En algunas realizaciones, la matriz polimérica puede estar rodeada por una capa de revestimiento (por ejemplo, liposoma, una monocapa lipídica, micela, etc.). En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, y/o un agente inmunoestimulador pueden asociarse con la matriz polimérica. En dichas realizaciones, el agente inmunomodulador, el resto de direccionamiento, y/o el agente inmunoestimulador están encapsulados eficazmente en el nanotransportador.
- 55
- 60 En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, y/o el agente inmunoestimulador pueden estar asociados con una matriz polimérica. En algunas realizaciones, la asociación covalente está mediada por un enlazador. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador y/o el resto de direccionamiento pueden no estar asociados con la matriz polimérica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un agente inmunomodulador y/o un resto de direccionamiento puede estar encapsulado, rodeado por, y o disperso a través de una matriz polimérica. De forma alternativa o adicional, un agente inmunomodulador y/o un resto de direccionamiento puede estar asociado con una matriz polimérica mediante interacciones hidrófobas, interacciones
- 65

de carga, fuerzas de van der Waals, etc.

Se conocen en la técnica de administración de fármacos una amplia variedad de polímeros y métodos para formar matrices poliméricas a partir de los anteriores. En general, una matriz polimérica comprende uno o más polímeros.

5 Los polímeros pueden ser polímeros naturales o polímeros no naturales (sintéticos). Los polímeros pueden ser homopolímeros o copolímeros que comprenden dos o más monómeros. En términos de secuencia, los copolímeros pueden ser aleatorios, en bloque o comprender una combinación de secuencias aleatorias y en bloque. Normalmente, los polímeros de acuerdo con la presente invención son polímeros orgánicos.

10 Los ejemplos de polímeros incluyen polietilenos, policarbonatos (por ejemplo, poli(1,3-dioxan-2ona)), polianhídridos (por ejemplo, poli(anhídrido sebácico)), polihidroxiácidos (por ejemplo, poli(β -hidroxialcanoato)), polipropilfumaratos, policaprolactonas, poliamidas (por ejemplo, policaprolactama), poliacetales, poliéteres, poliésteres (por ejemplo, poliláctido, poliglicólido), poli(ortoésteres), policianoacrilatos, poli(alcoholes vinílicos), poliuretanos, polifosfacenos, poliacrilatos, polimetacrilatos, poliureas, poliestirenos, y poliaminas.

15 Los polímeros incluyen polímeros que se han homologado para uso en seres humanos por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) según el 21 C.F.R. § 177.2600, incluyendo poliésteres (por ejemplo, ácido poliláctico, poli(ácido láctico-co-glicólico), policaprolactona, polivalerolactona, poli(1,3-dioxan-2ona)); polianhídridos (*por ejemplo*, anhídrido poli(sebácico)); poliéteres (*por ejemplo*, polietilenglicol); poliuretanos; polimetacrilatos; poliacrilatos; y policianoacrilatos.

25 Los polímeros pueden ser hidrófilos. Por ejemplo, los polímeros pueden comprender grupos aniónicos (por ejemplo, grupo fosfato, grupos sulfato, grupo carboxilato); grupos catiónicos (*por ejemplo*, grupo amino cuaternario); o grupos polares (por ejemplo, grupos hidroxilo, grupos tiol, grupos amina). Un nanotransportador que comprende una matriz polimérica hidrófila genera un entorno hidrófilo en el nanotransportador.

Los polímeros pueden ser hidrófobos. En algunas realizaciones, un nanotransportador que comprende una matriz polimérica hidrófoba genera un entorno hidrófobo en el nanotransportador.

30 En algunas realizaciones, los polímeros pueden estar modificados con uno o más restos y/o grupos funcionales. Cualquier resto o grupo funcional puede utilizarse de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, los polímeros pueden estar modificados con polietilenglicol (PEG), con un hidrato de carbono, y/o con poliacetales acíclicos derivados de polisacáridos (Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301).

35 En algunas realizaciones, los polímeros pueden estar modificados con un lípido o un grupo de ácido graso, las propiedades de los cuales se describen en detalle adicional a continuación. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser uno o más de ácido butírico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behénico, o lignocérico. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser uno o más de ácido palmitoleico, oleico, vacénico, linoleico, alfa-linoleico, gamma-linoleico, araquidónico, gadoleico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico, o ácido erúxico.

45 Los polímeros incluyen poliésteres, incluyendo copolímeros que comprenden unidades de ácido láctico y ácido glicólico, tales como poli(ácido láctico-co-glicólico) y poli(láctido-co-glicólido), denominados conjuntamente en el presente documento "PLGA"; y homopolímeros que comprenden unidades de ácido glicólico, denominados en el presente documento "PGA", y unidades de ácido láctico, tales como ácido poli-L-láctico, ácido poli-D-láctico, ácido poli-D,L-láctico, poli-L-láctido, poli-D-láctido, y poli-D,L-láctido, denominados conjuntamente en el presente documento "PLA" Los poliésteres incluyen, por ejemplo, polihidroxiácidos; copolímeros de PEG y copolímeros de láctido y glicólidos (por ejemplo, copolímeros PLA-PEG, copolímeros PGA-PEG, copolímeros PLGA-PEG, y sus derivados. Los poliésteres también incluyen, por ejemplo, polianhídridos, poli(ortoéster), copolímeros de poli(ortoéster)-PEG, poli(caprolactona), copolímeros de poli(caprolactona)-PEG, polilisina, copolímeros de polilisina-PEG, poli(etilenimina), copolímeros de poli(etilenimina)-PEG, poli(L-láctido-co-L-lisina), poli(éster de serina), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina), ácido poli[α -(4-aminobutil)-L-glicólico], y sus derivados.

55 En algunas realizaciones, un polímero puede ser PLGA. PLGA es un copolímero biocompatible y biodegradable de ácido láctico y ácido glicólico, y diversas formas de PLGA se caracterizan por la relación de ácido láctico:ácido glicólico. El ácido láctico pueden ser ácido L-láctico, ácido D-láctico, o ácido D,L-láctico. El índice de degradación de PLGA puede ajustarse alterando la relación ácido láctico: ácido glicólico. En algunas realizaciones, el PLGA que va a utilizarse de acuerdo con la presente invención se caracteriza por una relación ácido láctico:ácido glicólico de aproximadamente 85:15, de aproximadamente 75:25, de aproximadamente 60:40, de aproximadamente 50:50, de aproximadamente 40:60, de aproximadamente 25:75 o de aproximadamente 15:85.

65 Los polímeros incluyen uno o más polímeros acrílicos. Los polímeros acrílicos incluyen, por ejemplo, copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de metacrilato de aminoalquilo, poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), copolímero de ácido metacrílico-acrilamida, poli (metacrilato de metilo), poli(anhídrido del ácido metacrílico), metacrilato de metilo polimetacrilato, copolímero de poli (metacrilato de metilo) , poliacrilamida, copolímero de metacrilato de aminoalquilo,

copolímeros de metacrilato de glicidilo, policianoacrilatos, y combinaciones que comprenden uno o más de los polímeros anteriores. El polímero acrílico puede comprender copolímeros completamente copolimerizados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico con un bajo contenido de grupos amonio cuaternario.

- 5 Los polímeros incluyen polímeros catiónicos. En general, los polímeros catiónicos se pueden condensar y/o proteger las hebras de ácidos nucleicos cargadas negativamente (por ejemplo, ADN, ARN, o sus derivados). Los polímeros que contienen amina tales como poli(lisina) (Zauner et al., 1998, *Adv. Drug Del. Rev.*, 30:97; y Kabanov et al., 1995, *Bioconjugate Chem.*, 6:7), poli(etilenimina) (PEI; Boussif et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1995, 92:7297), y dendrímeros de poli(amidoamina) (Kukowska-Latallo et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93:4897; Tang et al., 10 1996, *Bioconjugate Chem.*, 7:703; y Haensler et al., 1993, *Bioconjugate Chem.*, 4:372) están cargados positivamente a pH fisiológico, forman pares iónicos con ácidos nucleicos, y median la transfección en varias líneas de células.

- Los polímeros incluyen poliésteres degradables que contienen cadenas secundarias catiónicas (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:11010; Kwon et al., 1989, *Macromolecules*, 22:3250; Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633; y Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23:3399). Los 15 ejemplos de estos poliésteres incluyen poli(L-láctido-co-L-lisina) (Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:11010), poli(éster de serina) (Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23:3399), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina) (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; y Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633), y poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina) (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; y Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633).

- Los polímeros incluyen hidratos de carbono, las propiedades de los cuales se describen en detalle adicional a 20 continuación. Un hidrato de carbono puede ser un polisacárido que comprende azúcares sencillos (o sus derivados) unidos mediante enlaces glucosídicos, tal como se conoce en la técnica. Un hidrato de carbono puede ser uno o más de pululano, celulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropil metilcelulosa, hidroxicelulosa, metilcelulosa, dextrano, ciclodextrano, glucógeno, almidón, hidroxietilalmidón, carragenato, glicona, amilosa, quitosán, N,O-carboximetilquitosán, algina y ácido alginico, almidón, quitina, heparina, konjac, glucomanano, pustulano, heparina, ácido hialurónico, curdlan, y xantano.

- Los polímeros incluyen una proteína o un péptido. las propiedades de los cuales se describen en detalle adicional a 25 continuación. Las proteínas ilustrativas incluyen albúmina, colágeno, un poli(aminoácido) (por ejemplo, polilisina), un anticuerpo, etc.

- Los polímeros incluyen un ácido nucleico (es decir, polinucleótido), las propiedades de los cuales se describen en 30 detalle adicional a continuación. Los polinucleótidos ilustrativos incluyen ADN, ARN, etc.

- Las propiedades de estos y otros polímeros y métodos para prepararlos son bien conocidos en la técnica (véase, por 35 ejemplo, Las patentes de Estados Unidos 6.123.727; 5.804.178; 5.770.417; 5.736.372; 5.716.404; 6.095.148; 5.837.752; 5.902.599; 5.696.175; 5.514.378; 5.512.600; 5.399.665; 5.019.379; 5.010.167; 4.806.621; 4.638.045; y 4.946.929; Wang et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:9480; Lim et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:2460; Langer, 2000, *Acc. Chem. Res.*, 33:94; Langer, 1999, *J. Control. Release*, 62:7; y Urich et al., 1999, *Chem. Rev.*, 99:3181). Más generalmente, se describen varios métodos para sintetizar polímeros adecuados en *Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts*, Ed. por Goethals, Pergamon Press, 1980; *Principles of Polymerization* de Odian, John Wiley & Sons, Cuarta edición, 2004; *Contemporary Polymer Chemistry* de Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, *Nature*, 390:386; y en las patentes de Estados Unidos 6.506.577, 40 6.632.922, 6.686.446 y 6.818.732.

- Los polímeros incluyen polímeros lineales o ramificados. Los polímeros incluyen dendrímeros. Los polímeros pueden 45 estar sustancialmente reticulados entre sí. Los polímeros pueden estar sustancialmente exentos de reticulación. Los polímeros se pueden usar sin usar una etapa de reticulación.

- Se entenderá adicionalmente que los nanotransportadores inventivos pueden comprender copolímeros de bloques, 50 copolímeros de injerto, combinaciones, mezclas, y/o aductos, de cualquiera de los anteriores y otros polímeros.

- En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas comprenden agentes inmunomoduladores incluidos 55 en el interior de micelas inversas.

Nanotransportadores que comprenden entidades anfífilas

- En algunas realizaciones, los nanotransportadores pueden comprender opcionalmente una o más entidades 60 anfífilas. En algunas realizaciones, una entidad anfífilica puede promover la producción de nanotransportadores con estabilidad aumentada, uniformidad mejorada, o viscosidad aumentada. En algunas realizaciones, las entidades anfífilicas pueden estar asociadas con la superficie interior de la membrana membrana (por ejemplo, una bicapa lipídica, una monocapa lipídica, etc.). Por ejemplo, si la superficie interior de una membrana lipídica es hidrófila, el espacio encapsulado en el nanotransportador lipídico es hidrófilo. Sin embargo, si una entidad anfífilica está 65 asociada con la superficie interior de la membrana lipídica hidrófila de tal manera que el extremo hidrófilo de la entidad anfífilica está asociado con la superficie interior de la membrana lipídica hidrófila y el extremo hidrófobo de la

entidad anfífilica está asociado con el interior del nanotransportador, el espacio encapsulado en el nanotransportador es hidrófobo.

5 Cualquier entidad anfífilica conocida en la técnica es adecuada para el uso en la preparación de nanotransportadores de acuerdo con la presente invención. Dichas entidades anfífilicas incluyen, pero sin limitación, fosfoglicéridos; fosfatidilcolinas; dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC); dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE);
 10 dioleiloxipropiltriethylamonio (DOTMA); dioleoilfosfatidilcolina; colesterol; ésteres de colesterol; diacilglicerol; diacilglicerolsuccinato; difosfatidil glicerol (DPPG); hexanodecanol; alcoholes grasos tales como polietilenglicol (PEG); polioxietileno-9-lauril éter; un ácido graso tensioactivo, tal como ácido palmítico o ácido oleico; ácidos grasos; monoglicéridos de ácidos grasos; diglicéridos de ácidos grasos; amidas de ácidos grasos; glicocolato trioleato de sorbitán (Span®85); monolaurato de sorbitán (Span®20); polisorbato 20 (Tween®20); polisorbato 60 (Tween®60); polisorbato 65 (Tween®65); polisorbato 80 (Tween®80); polisorbato 85 (Tween®85); monoestearato de polioxietileno; surfactina; un polaxámero; un éster de ácido graso de sorbitán tal como trioleato de sorbitán; lecitina; lisolecitina; fosfatidilserina; fosfatidilinositol; esfingomielina; fosfatidiletanolamina (cefalina); cardiolipina; ácido
 15 fosfatídico; cerebrósidos; dicetilfosfato; dipalmitoilfosfatidilglicerol; estearilamina; dodecilamina; hexadecilamina; palmitato de acetilo; ricinoleato de glicerilo; estearato de hexadecilo; miristato de isopropilo; tiloxapol; poli(etilenglicol)5000-fosfatidiletanolamina; monoestearato de poli(etilenglicol)400; fosfolípidos; detergentes sintéticos y/o naturales que tienen propiedades tensioactivas elevadas; desoxicolatos; ciclodextrinas; sales caótopas; agentes de emparejamiento de iones; y combinaciones de los mismos. Un componente de una entidad anfífilica puede ser
 20 una mezcla de diferentes entidades anfífilicas. Estas entidades anfífilicas pueden extraerse y purificarse a partir de una fuente natural o pueden prepararse sintéticamente en un laboratorio. En determinadas realizaciones específicas, están comercialmente disponibles entidades anfífilicas.

25 Los expertos en la materia reconocerán que esto es una lista de sustancias ilustrativas, no comprehensivas, con actividad tensioactiva. Se puede utilizar cualquier entidad anfífilica en la producción de nanotransportadores que se van a usar de acuerdo con la presente invención.

Nanotransportadores de vacunas que comprenden hidratos de carbono

30 En algunas realizaciones, los nanotransportadores pueden comprender opcionalmente uno o más hidratos de carbono. Los hidratos de carbono pueden ser naturales o sintéticos. un hidrato de carbono puede ser un hidrato de carbono natural derivatizado. En determinadas realizaciones, un hidrato de carbono es un monosacárido, incluyendo, aunque no de forma limitativa, glucosa, fructosa, galactosa, ribosa, lactosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, celobiosa, manosa, xilosa, arabinosa, ácido glucurónico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina, y ácido neuramínico. En determinadas realizaciones, un hidrato de carbono es un disacárido, incluyendo, aunque no de forma limitativa, lactosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, y celobiosa. En determinadas realizaciones, un hidrato de carbono es un polisacárido, incluyendo, aunque no de forma limitativa, pululano, celulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), hidroxixelulosa (HC), metilcelulosa (MC), dextrano, ciclodextrano, glucógeno, almidón, hidroxietilalmidón, carragenato, glicona, amilosa, quitosán, N,O-carboximetilquitosán, algina y ácido algínico, almidón, quitina, heparina, konjac, glucomanano, pustulano, heparina, ácido hialurónico, curdlan, y xantano. En determinadas realizaciones, el hidrato de carbono es un alcohol azucarado, incluyendo, aunque no de forma limitativa, manitol, sorbitol, xilitol, eritritol, maltitol, y lactitol.

Partículas asociadas con nanotransportadores de vacunas

45 En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas de acuerdo con la presente invención pueden comprender una o más partículas. En algunas realizaciones, una o más partículas se asocian con un nanotransportador de vacunas. En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas comprenden una o más partículas asociadas con la superficie exterior del nanotransportador. En algunas realizaciones, las partículas pueden asociarse con el nanotransportador de vacunas mediante enlace covalente. En algunas realizaciones, las partículas pueden asociarse con nanotransportadores de vacunas mediante interacciones no covalentes (por ejemplo, interacciones de carga, interacciones de afinidad, coordinación metálica, adsorción física, interacciones hospedador-huésped, interacciones hidrófobas, interacciones de apilado de TT, interacciones de enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electroestáticas, interacciones dipolo-dipolo, y/o sus combinaciones). En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas comprenden una o más partículas incluidas en la superficie del nanotransportador. En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas comprenden una o más partículas incluidas en la superficie del nanotransportador (por ejemplo, incluidas en una bicapa lipídica). En algunas realizaciones, las partículas asociadas con un nanotransportador permiten una rigidez de membrana adaptable y una estabilidad liposómica controlable.

60 En algunas realizaciones, las partículas que se van a asociar con un nanotransportador de vacunas pueden comprender una matriz polimérica, tal como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, las partículas que se van a asociar con un nanotransportador de vacunas pueden comprender componentes no poliméricos (por ejemplo, partículas metálicas, puntos cuánticos, partículas cerámicas, partículas óseas, partículas víricas, etc.), tal como se ha descrito anteriormente.

65 En algunas realizaciones, una partícula que se va a asociar con un nanotransportador de vacunas puede tener una

carga negativa. En algunas realizaciones, una partícula que se va a asociar con un nanotransportador de vacunas puede tener una carga positiva. En algunas realizaciones, una partícula que se va a asociar con un nanotransportador de vacunas puede ser eléctricamente neutra.

5 En algunas realizaciones, la partícula tiene uno o más restos amina en su superficie. Los restos amina pueden ser, por ejemplo, restos de aminas alifáticas. En determinadas realizaciones, la amina es una amina primaria, secundarias, terciaria, o cuaternaria. En determinadas realizaciones, la partícula comprende un polímero que contiene aminas. En determinadas realizaciones, el nanotransportador comprende un lípido que contiene aminas. En determinadas realizaciones, las partículas comprenden una proteína o un péptido que está cargado positivamente a
10 pH neutro. En algunas realizaciones, el nanotransportador con el uno o más restos amina sobre su superficie tiene una carga positiva neta a pH neutro. Otros restos químicos que proporcionan una carga positiva a pH neutro pueden utilizarse también en las partículas inventivas.

El potencial zeta es una medición de potencial superficial de una partícula. En algunas realizaciones, la partícula
15 tiene un potencial zeta positivo. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta comprendido entre -50 mV y +50 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta comprendido entre -25 mV y +25 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta comprendido entre -10 mV y +10 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta comprendido entre -5 mV y +5 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta comprendido entre 0 mV y +50 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta comprendido entre 0 mV y +25 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta comprendido entre 0 mV y +10 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta comprendido entre 0 mV y +5 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta comprendido entre -50 mV y 0 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta comprendido entre -25 mV y 0 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta comprendido entre -10 mV y 0
25 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta comprendido entre -5 mV y 0 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta sustancialmente neutro (*es decir*, aproximadamente 0 mV).

Se pueden usar varias partículas diferentes de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, las partículas son esferas o esferoides. En algunas realizaciones, las partículas son esferas o esferoides. En algunas
30 realizaciones, las partículas tienen forma plana o de placa. En algunas realizaciones, las partículas son cubos o cuboides. En algunas realizaciones, las partículas son óvalos o elipses. En algunas realizaciones, las partículas son cilindros, conos, o pirámides.

Las partículas (por ejemplo, nanopartículas, micropartículas) pueden prepararse utilizando cualquier método conocido en la materia. Por ejemplo, se pueden formar formulaciones de partículas mediante métodos como nanoprecipitación, centrado de flujo usando canales de fluido, secado por pulverización, evaporación en disolvente mediante emulsión única y doble, extracción con disolvente, separación de fases, molienda, procedimiento de microemulsión, microfabricación, nanofabricación, capas de sacrificio, coacervación simple y coacervación compleja, y otros métodos bien conocidos por las personas normalmente expertas en la técnica. De forma alternativa o
40 adicional, se puede utilizar la síntesis de disolventes acuosos y orgánicos para semiconductores monodispersos, conductores, magnéticos, orgánicos y se han descrito otras nanopartículas (Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545; y Trindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843).

En determinadas realizaciones, las partículas se preparan mediante el proceso de nanoprecipitación o el secado mediante pulverización. Las condiciones utilizadas en la preparación de partículas pueden alterarse para dar como resultado partículas de un tamaño o propiedad deseados (por ejemplo, hidrofobia, hidrofiliidad, morfología externa, "adherencia", forma, etc.). El método de preparación de las partículas y las condiciones conditions (por ejemplo, disolvente, temperatura, concentración, caudal de aire, etc.) utilizados pueden depender del agente terapéutico que se va a administrar y/o de la composición de la matriz polimérica.
50

Se describen en la bibliografía los métodos de preparación de micropartículas de agentes encapsulados (véase, *por ejemplo*, Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275; y Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755).
55

Si las partículas preparadas mediante cualquiera de los anteriores métodos tiene un intervalo de tamaño fuera del intervalo deseado, las partículas se pueden dimensionar, por ejemplo, usando un tamiz.

Producción de nanotransportadores de vacunas

60 Los nanotransportadores de vacuna pueden prepararse usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden formarse formulaciones de nanotransportadores particulados mediante métodos como la nanoprecipitación, centrado de flujo usando canales de fluido, secado por pulverización, evaporación en disolvente mediante emulsión única y doble, extracción con disolvente, separación de fases, molienda, procedimiento de microemulsión, microfabricación, nanofabricación, capas de sacrificio, coacervación simple y coacervación compleja, y otros métodos bien conocidos por las personas normalmente expertas en la técnica. De forma alternativa o
65

adicional, se puede utilizar la síntesis de disolventes acuosos y orgánicos para semiconductores monodispersos, conductores, magnéticos, orgánicos y se han descrito otras nanopartículas (Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545; y Trindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843).

- 5 En determinadas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas se preparan mediante el proceso de nanoprecipitación o el secado mediante pulverización. Las condiciones utilizadas en la preparación de nanotransportadores pueden alterarse para dar como resultado partículas de un tamaño o propiedad deseados (por ejemplo, hidrofobia, hidrofiliadad, morfología externa, "adherencia", forma, etc.). El método de preparación del nanotransportador y las condiciones (por ejemplo, disolvente, la temperatura, concentración, caudal de aire, etc.)
10 utilizados pueden depender de la composición y/o la arquitectura resultante del nanotransportador de vacunas.

Se describen en la bibliografía los métodos de preparación de micropartículas de agentes encapsulados (véase, por ejemplo, Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymer, 6:275; y
15 Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755).

Los nanotransportadores de vacunas inventivos pueden fabricarse utilizando cualquier método disponible. Es deseable asociar agentes inmunomoduladores, restos de direccionamiento, y/o agentes inmunoestimuladores a los nanotransportadores de vacunas sin afectar de forma adversa a las características tridimensionales y a la
20 conformación de los agentes inmunomoduladores, un resto de direccionamiento, y/o agentes inmunoestimuladores. Es deseable que el nanotransportador de vacunas deba ser capaz de evitar la captación por el sistema fagocítico mononuclear tras la administración sistémica de tal manera que sea capaz de alcanzar células específicas en el cuerpo.

25 Los agentes inmunomoduladores se liberan mediante difusión, degradación del nanotransportador de vacunas, y/o sus combinaciones. En algunas realizaciones, los polímeros se degradan mediante erosión volumétrica. En algunas realizaciones, los polímeros se degradan mediante erosión superficial.

La liberación y la administración del agente inmunomodulador a un sitio diana se produce perturbando la asociación.
30 Por ejemplo, si un agente inmunomodulador se asocia con un nanotransportador mediante un enlazador escindible, el agente inmunomodulador se libera y administra al sitio diana tras la escisión del enlazador.

Se puede conseguir la asociación física de varias formas diferentes. La asociación física puede ser covalente o no covalente. El nanotransportador de vacunas, un agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, un agente
35 inmunoestimulador, y/o una nanopartícula pueden asociarse directamente entre sí, por ejemplo, mediante uno o más enlaces covalentes, o pueden asociarse por medio de uno o más enlazadores. En una realización, un enlazador forma uno o más enlaces covalentes o no covalentes en el agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, un agente inmunoestimulador, y/o una nanopartícula y uno o más enlaces covalentes o no covalentes con el agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, un agente inmunoestimulador, y/o una nanopartícula, uniéndolos
40 por tanto entre sí. En algunas realizaciones, un primer enlazador forma un enlace covalente o no covalente con el nanotransportador de vacunas y un segundo enlazador forma un enlace covalente o no covalente con el agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, un agente inmunoestimulador y/o la nanopartícula. Los dos enlazadores forman uno o más enlace(s) covalentes o no covalentes entre sí.

45 Se puede usar cualquier enlazador adecuado de acuerdo con la presente invención. Los enlazadores pueden usarse para formar enlaces amida, enlaces éster, enlaces disulfuro, etc. los enlazadores pueden contener átomos de carbono o heteroátomos (por ejemplo, nitrógeno, oxígeno, azufre, etc.). Normalmente, los enlazadores tienen 1 a 50 átomos de longitud, 1 a 40 átomos de longitud, 1 a 25 átomos de longitud, 1 a 20 átomos de longitud, 1 a 15 átomos de longitud, 1 a 10 átomos de longitud, o 1 a 10 átomos de longitud. Se pueden sustituir los enlazadores con
50 diversos sustituyentes que incluyen, pero no limitándose a, átomos de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, amino, alquilamino, dialquilamino, trialkilamino, hidroxilo, alcoxi, halógeno, arilo, heterocíclico, heterocíclico aromático, ciano, amida, carbamoilo, ácido carboxílico, éster, tioéter, alquiltioéter, tiol, y grupos ureido. Como apreciará una persona normalmente experta en esta materia, cada uno de estos grupos puede a la vez estar sustituido.

55 En algunas realizaciones, un enlazador es un enlazador alifático o heteroalifático. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador de polialquilo. En determinadas realizaciones, el enlazador es un enlazador de poliéter. En determinadas realizaciones, el enlazador es un enlazador de polietileno. En determinadas realizaciones específicas, el enlazador es un enlazador de polietilenglicol (PEG).

60 En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador escindible. Por proporcionar unos pocos ejemplos, los enlazadores escindibles incluyen enlazadores peptídicos escindibles por proteasas, enlazadores de ácidos nucleicos sensibles a nucleasas, enlazadores lipídicos sensibles a lipasas, enlazadores de hidratos de carbono sensibles a glucosidasa, enlazadores sensibles al pH, enlazadores sensibles a hipoxia, enlazadores fotoescindibles, enlazadores termolábiles, enlazadores escindibles por enzimas (por ejemplo, enlazadores escindibles por esterasas),
65 enlazadores sensibles a ultrasonidos, enlazadores escindibles por rayos x, etc. En algunas realizaciones, el enlazador no es un enlazador escindible.

Se pueden utilizar cualquiera de varios métodos para asociar un enlazador con un nanotransportador de vacunas. Las estrategias generales incluyen la adsorción pasiva (por ejemplo, mediante interacciones electrostáticas), quelación multivalente, unión no covalente de elevada afinidad entre miembros de un par de unión específico, formación de enlaces covalentes, etc. (Gao et al., 2005, Curr. Op. Biotechnol., 16:63). En algunas realizaciones, se puede usar la química clic para asociar un enlazador con una partícula (por ejemplo, la reacción de Diels-Alder, la cicloadición 1,3 dipolar de Huisgen, sustitución nucleófila, química del carbonilo, epoxidación, dihidroxilación, etc.).

Se puede emplear un reactivo de reticulación bifuncional. Dichos reactivos contienen dos grupos reactivos, proporcionando por tanto un medio de asociar covalentemente dos grupos diana. Los grupos reactivos en un reactivo de reticulación química pertenecen normalmente a diversas clases de grupos funcionales tales como ésteres de succinimidilo, maleimidias, y piridilsulfuros. Los agentes de reticulación ilustrativos incluyen, *por ejemplo*, carbodiimidas, ácido N-hidroxisuccinimidil-4-azidosalicílico (NHS-ASA), diclorhidrato de dimetil pimelidato (DMP), dimetilsuberimidato (DMS), 3,3'- ditiobispropionimidato (DTBP), N-Succinimidil 3-[2-piridilditio]-propionamido (SPDP), succinimidil α -metilbutanoato, éster de N-hidroxisuccinimida del ácido biotinamidoheptanoil-6-amino-hexanoico (SMCC), éster de succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-dodecaetilenglicol] (NHS-PEO12), etc. Por ejemplo, la formación de amida mediada por carbodiimida y la amina mediada por éster de maleimida activo y el acoplamiento del sulfhidrilo son soluciones ampliamente utilizadas.

En algunas realizaciones, puede formarse un nanotransportador de vacunas acoplando un grupo amina en una molécula a un grupo tiol en una segunda molécula. algunas veces en una secuencia de reacción en dos o tres etapas. Una molécula que contiene tiol puede hacerse reaccionar con una molécula que contiene amina utilizando un reactivo de reticulación heterobifuncional, *por ejemplo*, un reactivo que contiene a la vez un éster de succinimidilo y cualquiera de una maleimida, un piridil sulfhidrilo, o una yodoacetamida. Se pueden usar una reticulación de amina-ácido carboxílico y tiol-ácido carboxílico, las químicas de acoplamiento de maleimida-sulfhidrilo (por ejemplo, el método del éster de maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, etc. Los polipéptidos pueden unirse convenientemente a partículas mediante grupos amina o tiol en cadenas secundarias de lisina o cisteína, respectivamente, o mediante un grupo amino N terminal. Los ácidos nucleicos tales como los ARN pueden sintetizarse con un grupo amino terminal. Pueden utilizarse varios reactivos de acoplamiento (por ejemplo, 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) y sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (sulfo-SMCC) para asociar los diversos componentes de los nanotransportadores de vacunas. Los nanotransportadores de vacunas pueden prepararse con grupos funcionales, *por ejemplo*, grupos amina o carboxilo, disponibles en la superficie para facilitar la asociación con una biomolécula.

Se pueden emplear interacciones de unión específica no covalentes. Por ejemplo, tanto una partícula como una biomolécula pueden funcionalizarse con biotina funcionalizándose la otra con estreptavidina. Estos dos restos se unen específicamente entre sí de forma no covalente y con elevada afinidad, asociando por tanto la partícula y la biomolécula. Podrían utilizarse de manera similar otras parejas de unión específicas. Como alternativa, las biomoléculas etiquetadas con histidina pueden asociarse con partículas conjugadas a ácido nitrolotriácético-níquel (Ni-NTA).

Cualquier biomolécula puede unirse a una partícula, resto de direccionamiento, y/o agente terapéutico. El separador puede ser, por ejemplo, una cadena peptídica corta, *por ejemplo*, entre 1 y 10 aminoácidos de longitud, *por ejemplo*, 1,2, 3, 4 o 5 aminoácidos de longitud, un ácido nucleico, una cadena de alquilo, etc.

Para información general adicional sobre los métodos de asociación y/o conjugación y los reticuladores, véase la revista Bioconjugate Chemistry, publicada por la American Chemical Society, Columbus OH, PO Box 3337, Columbus, OH, 43210; "Cross-Linking", Pierce Chemical Technical Library, disponible en el sitio web de Pierce y publicada originalmente en el Catálogo de 1994-95 de Pierce, y las referencias citadas en el anterior; Wong SS, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press Publishers, Boca Raton, 1991; y Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, Inc., San Diego, 1996.

De forma alternativa o adicional, los nanotransportadores de vacunas pueden unirse a agentes inmunomoduladores, restos de direccionamiento, y/o nanopartículas directa o indirectamente mediante interacciones no covalentes. Las interacciones no covalentes incluyen, aunque no de forma limitativa, interacciones de carga, interacciones de afinidad, coordinación metálica, adsorción física, interacciones hospedador-huésped, interacciones hidrófobas, interacciones de apilado de TT, interacciones de enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo, y/o sus combinaciones.

En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas puede asociarse con un agente inmunomodulador, resto de direccionamiento, y/o nanopartícula mediante interacciones de carga. Por ejemplo, un nanotransportador de vacunas puede tener una superficie catiónica o puede hacerse reaccionar con un polímero catiónico, tal como poli(lisina) o poli(etilen imina), para proporcionar una superficie catiónica. La superficie del nanotransportador de vacunas puede a continuación unirse mediante interacciones de carga con un agente inmunomodulador cargado negativamente, un resto de direccionamiento, y/o una nanopartícula. Un extremo del agente inmunomodulador, resto de direccionamiento, y/o nanopartícula, normalmente, se une a un polímero cargado negativamente (por ejemplo, un

poli(ácido carboxílico) o una secuencia de oligonucleótido adicional que puede interactuar con la superficie del polímero catiónico sin perturbar la función del agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, y/o una nanopartícula.

5 En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas puede asociarse con un agente inmunomodulador, resto de direccionamiento, y/o nanopartícula mediante interacciones de afinidad. Por ejemplo, La biotina puede unirse a la superficie del nanotransportador de vacunas y la estreptavidina puede unirse al agente inmunomodulador, resto de direccionamiento, y/o nanopartícula; o a la inversa, la biotina puede unirse al agente inmunomodulador, resto de direccionamiento, y/o nanopartícula y la estreptavidina puede unirse a la superficie del nanotransportador de vacunas. El grupo biotina y la estreptavidina pueden unirse al nanotransportador de vacunas o al agente inmunomodulador, resto de direccionamiento, y/o nanopartícula mediante un enlazador, tal como un enlazador de alquileo o un enlazador de poliéter. La biotina y la estreptavidina se unen mediante interacciones de afinidad, uniéndose de esta forma el nanotransportador de vacunas al agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, y/o una nanopartícula.

15 En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas puede asociarse con un agente inmunomodulador, resto de direccionamiento, y/o nanopartícula mediante coordinación metálica. Por ejemplo, se puede unir una polihistidina a un extremo del agente inmunomodulador, resto de direccionamiento, y/o nanopartícula, y se puede unir un ácido nitrolotriácético a la superficie del nanotransportador de vacunas. Un metal, tal como Ni^{2+} , quelará la polihistidina y el ácido nitroloacético, uniéndose de este modo el agente inmunomodulador, el resto de direccionamiento, y/o la nanopartícula al nanotransportador de vacunas.

25 En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas puede asociarse con un agente inmunomodulador, resto de direccionamiento, y/o nanopartícula mediante adsorción física. Por ejemplo, una cola hidrófoba, tal como polimetacrilato o un grupo alquilo que tiene al menos aproximadamente 10 carbonos, puede unirse a un extremo del agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, y/o una nanopartícula. La cola hidrófoba se adsorberá sobre la superficie de un nanotransportador de vacunas hidrófobo, uniéndose de este modo el agente inmunomodulador, el resto de direccionamiento, y/o la nanopartícula al nanotransportador de vacunas.

30 En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas puede asociarse con un agente inmunomodulador, resto de direccionamiento, y/o nanopartícula mediante interacciones hospedador-huésped. Por ejemplo, un hospedador macrocíclico, tal como cucurbiturilo o ciclodextrina, puede unirse a la superficie del nanotransportador de vacunas y a un grupo huésped, tal como un grupo alquilo, un polietilenglicol, o un grupo diaminoalquilo, puede unirse al agente inmunomodulador, resto de direccionamiento, y/o nanopartícula; o a la inversa, el grupo hospedador puede unirse al agente inmunomodulador, resto de direccionamiento, y/o nanopartícula y el grupo huésped puede unirse a la superficie del nanotransportador de vacunas. En algunas realizaciones, el hospedador y/o la molécula huésped pueden unirse al agente inmunomodulador, resto de direccionamiento, y/o nanopartícula o el nanotransportador de vacunas mediante un enlazador, tal como un enlazador de alquileo o un enlazador de poliéter.

40 En algunas realizaciones, un nanotransportador de vacunas puede asociarse con un agente inmunomodulador, resto de direccionamiento, y/o nanopartícula mediante interacciones de enlace de hidrógeno. Por ejemplo, un oligonucleótido que tiene una secuencia concreta puede unirse a la superficie del nanotransportador de vacunas y una secuencia esencialmente complementaria puede unirse a uno o a ambos extremos del agente inmunomodulador, resto de direccionamiento, y/o nanopartícula de tal manera que no perturba la función del agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, y/o una nanopartícula. El agente inmunomodulador, resto de direccionamiento, y/o nanopartícula se une a continuación al nanotransportador de vacunas mediante emparejamiento de bases complementarias con el oligonucleótido unido al nanotransportador de vacunas. Dos oligonucleótidos son esencialmente complementarios si aproximadamente un 80 % de las bases de ácido nucleico en un oligonucleótido forman enlaces de hidrógeno mediante un sistema de emparejamiento de bases de oligonucleótidos, tal como un emparejamiento de bases de Watson-Crick, emparejamiento inverso de bases de Watson-Crick, emparejamiento de bases de Hoogsteen, etc., con una base en el segundo oligonucleótido. Normalmente, es deseable que una secuencia de oligonucleótidos se una al nanotransportador de vacunas para formar al menos aproximadamente 6 pares de bases complementarias con un oligonucleótido complementario unido al agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, y/o una nanopartícula.

55 En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas se preparan mediante autoensamblaje. Para un ejemplo detallado de autoensamblaje de nanotransportadores de vacunas, véanse los Ejemplos 1 y 2. En un ejemplo comparativo, liposomas pequeños (10 nm - 1000 nm) se fabricaron y emplearon para administrar uno o múltiples agentes inmunomoduladores a células del sistema inmunitario (Figura 3). En general, los liposomas son vesículas lipídicas esféricas construidas artificialmente, cuyo diámetro controlable de decenas a miles de nm significa que los liposomas individuales comprenden compartimentos biocompatibles con un volumen de zeptolitros (10^{-21} l) a femtolitros (10^{-15} l) que se pueden usar para encapsular y almacenar cargas diversas tales como proteínas, enzimas, ADN y moléculas de fármaco. Los liposomas pueden comprender una bicapa lipídica que tiene una propiedad anfifílica: ambas superficies interior y exterior de la bicapa son hidrófilas; y la luz de la bicapa es hidrófoba. Las moléculas lipófilas pueden replegarse de forma espontánea formando membranas de liposoma y retienen sus dominios hidrófilos en el exterior, y las moléculas hidrófilas se pueden conjugar químicamente a la superficie exterior

del liposoma, aprovechando la biofuncionalidad de la membrana.

En un ejemplo comparativo, los liposomas estabilizados con nanopartículas son útiles para administrar uno o una pluralidad de agentes inmunomoduladores a las células del sistema inmunitario (Figura 4). Al permitir que se adsorban pequeñas nanopartículas cargadas (1 nm - 30 nm) sobre la superficie del liposoma, los complejos de liposomas-nanopartículas no solo tienen las ventajas de los liposomas puros anteriormente mencionados (Figura 3), sino también una rigidez ajustable de la membrana y una estabilidad controlable del liposoma. Cuando las partículas de carga pequeña se acercan a la superficie de los liposomas que tienen bien carga opuesta o no tienen carga neta, la interacción electrostática o carga-dipolo entre las nanopartículas y la membrana atrae las nanopartículas para que permanezcan sobre la superficie de la membrana, quedando parcialmente envueltas por membrana lipídica. Esto induce una flexión local en la membrana y una tensión superficial globular de los liposomas, estos dos permiten ajustar la rigidez de la membrana. Este aspecto es importante para la administración de vacunas usando liposomas para imitar virus cuya rigidez depende de la composición de otros componentes biológicos incluidos dentro de la membrana del virus. Además, las nanopartículas adsorbidas forman una envoltura cargada que protege a los liposomas contra la fusión, potenciando de esta forma la estabilidad del liposoma. Las nanopartículas pequeñas se mezclan con los liposomas tras una vortización suave, y las nanopartículas se adhieren a la superficie del liposoma de forma espontánea. Las nanopartículas pequeñas pueden ser, pero sin limitación, nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas, nanopartículas inorgánicas u orgánicas, sus híbridos, y/o sus combinaciones.

En un ejemplo comparativo, los nanotransportadores de liposoma-polímero se utilizan para administrar uno o una pluralidad de agentes inmunomoduladores a las células del sistema inmunitario (Figura 5). En lugar de mantener el interior del liposoma hueco, los agentes inmunomoduladores pueden estar encapsulados. La Figura 3 muestra liposomas que están cargadas con nanopartículas de copolímeros dibloque para formar nanotransportadores poliméricos revestidos con liposomas, que tienen las ventajas tanto de los liposomas como de las nanopartículas poliméricas, aunque excluyendo algunas de sus limitaciones. La envoltura de liposomas se puede utilizar para transportar agentes inmunomoduladores lipófilos o hidrófilos conjugados, y el núcleo polimérico se puede usar para administrar agentes inmunomoduladores hidrófobos.

Las nanopartículas poliméricas preformuladas se mezclan con liposomas pequeños (20 nm - 100 nm) con vortización suave para inducir la fusión de liposomas sobre la superficie de nanopartículas poliméricas. Las nanopartículas de copolímeros dibloque pueden ser, pero sin limitación, uno de una pluralidad de los siguientes: poli(ácido D,L-láctico)-bloque-poli(etilenglicol) (PLA-b-PEG), poli(ácido D,L-glicólico)-bloque-poli(etilenglicol) (PLA-b-PEG), poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico)-bloque-poli(etilenglicol) (PLGA-b-PEG), y poli(ϵ -caprolactona)-bloque-poli(etilenglicol) (PCL-b-PEG).

Se usan nanotransportadores poliméricos de liposomas estabilizados con nanopartículas para administrar uno o una pluralidad de agentes inmunomoduladores (Figura 6). Mediante la adsorción de nanopartículas pequeñas (1 nm - 30 nm) en la superficie del nanotransportador de liposoma-polímero, el nanotransportador no solo tiene la ventaja de los liposomas estabilizados mediante nanopartículas anteriormente mencionados (Figura 4) y de las nanopartículas de liposoma-polímero anteriormente mencionadas (Figura 5), sino también una rigidez ajustable de la membrana y una estabilidad controlable del liposoma.

Los nanotransportadores de liposoma-polímero que contienen micelas inversas se utilizan para administrar uno o una pluralidad de agentes inmunomoduladores (Figura 7). Puesto que los nanotransportadores de liposoma-polímero anteriormente mencionados (Figuras 5 y 6) están limitados a transportar agentes inmunomoduladores hidrófobos dentro de nanopartículas poliméricas, aquí, se formulan micelas pequeñas (1 nm - 20 nm) inversas para encapsular agentes inmunomoduladores hidrófilos, y posteriormente mezclarlos con copolímeros dibloque para formular los núcleos poliméricos de liposomas.

Un agente inmunomodulador hidrófilo que se va a encapsular se incorpora en primer lugar en micelas inversas mezclando con entidades anfífilas naturalmente derivadas y entidades anfífilas no tóxicas en un compuesto volátil, un disolvente orgánico miscible en agua. La entidad anfífila puede ser, aunque no de forma limitativa, uno o una pluralidad de los siguiente. fosfatidilcolina, lípido A, colesterol, dolicol, esfingosina, esfingomielina, ceramida, glicosilceramidas, cerebrósido, sulfátido, fitoesfingosina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, cardiolipina, ácido fosfatídico, y lisofosfátidos. el compuesto volátil, disolvente orgánico miscible en agua puede ser, aunque no de forma limitativa: tetrahidrofurano, acetona, acetonitrilo, o dimetilformamida. Se puede añadir un polímero biodegradable a esta mezcla una vez que se ha completado la formación de micelas inversas. La mezcla resultante de polímero biodegradable y micela inversa se combina con un no disolvente hidrófilo insoluble en polímero para formar nanopartículas mediante la difusión rápida del disolvente en el no disolvente y evaporación del disolvente orgánico. El no disolvente hidrófilo insoluble en polímero puede ser uno o una pluralidad de los siguientes: agua, etanol, metanol, y sus mezclas. Las micelas inversas incluidas en nanopartículas poliméricas se mezclan con moléculas lipídicas para formar la estructura compleja de liposoma-polímero anteriormente mencionada (Figura 5).

Los nanotransportadores de liposoma-polímero estabilizados con nanopartículas que contienen micelas inversas se pueden utilizar para administrar uno o una pluralidad de agentes inmunomoduladores (Figura 8). Mediante la adsorción de nanopartículas pequeñas (1 nm - 30 nm) en la superficie de un nanotransportador de liposoma-

polímero, el nanotransportador no solo tiene la ventaja de los liposomas estabilizados mediante nanopartículas anteriormente mencionados (Figura 4) y de las nanopartículas de liposoma-polímero que contienen micelas inversas anteriormente mencionadas (Figura 7), sino también una rigidez ajustable de la membrana y una estabilidad controlable del liposoma.

5 Los nanotransportadores poliméricos estabilizados con una monocapa lipídica se pueden usar para administrar uno o una pluralidad de agentes inmunomoduladores (Figura 9). En comparación con el transportador de liposoma-polímero anteriormente mencionado (Figuras 5-8), este sistema tiene la ventaja de la simplicidad en lo que respecta tanto a los agentes como a la fabricación. Un homopolímero hidrófobo puede constituir el núcleo polimérico, a diferencia del copolímero dibloque usado en las Figuras 5-8, que tiene segmentos tanto hidrófobos como hidrófilos. 10 Los nanotransportadores poliméricos estabilizados con lípidos se pueden formar en una sola etapa en lugar de formular las nanopartículas poliméricas y los liposomas por separado, seguido por su fusión entre sí.

15 Una molécula hidrófila inmunomoduladora se puede conjugar químicamente en primer lugar con un grupo de cabeza lipídico. El conjugado se mezcla con una proporción determinada de moléculas lipídicas no conjugadas en una solución acuosa que contiene uno o más disolventes miscibles con agua. La entidad anfifílica puede ser una o una pluralidad de los siguiente. fosfatidilcolina, lípido A, colesterol, dolicol, esfingosina, esfingomiélinea, ceramida, cerebrósido, sulfátido, fitoesfingosina, fosfatidiletanolamina, glicosilceramidas, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, cardiolipina, ácido fosfatídico, y lisofosfátidos. El disolvente miscible con agua puede ser: acetona, etanol, metanol, y alcohol isopropílico. Un material polimérico biodegradable se mezcla con los agentes inmunomoduladores hidrófobos para su encapsulación en un disolvente orgánico miscible con el agua o parcialmente miscible con el agua. El 20 polímero biodegradable puede ser uno o una pluralidad de los siguientes: poli(ácido D,L-láctico); poli(ácido D,L-glicólico), poli(ϵ -caprolactona), o sus copolímeros a varias relaciones molares. El disolvente orgánico miscible con agua puede ser: acetona, etanol, metanol, o alcohol isopropílico. El disolvente orgánico parcialmente miscible con 25 parcialmente agua puede ser: acetonitrilo, tetrahidrofurano, acetato de etilo, alcohol isopropílico, acetato de isopropilo o dimetilformamida. La solución polimérica resultante se añade a la solución acuosa de lípido conjugado y no conjugado para producir nanopartículas mediante la difusión rápida del disolvente orgánico en el agua y la evaporación del disolvente orgánico.

30 Las nanopartículas poliméricas estabilizadas con una monocapa lipídica que comprenden micelas inversas se pueden utilizar para administrar uno o una pluralidad de agentes inmunomoduladores (Figura 10). Puesto que los nanotransportadores poliméricos estabilizados con lípidos (Figura 9) están limitados a transportar agentes inmunomoduladores hidrófobos, en este caso, se formulan micelas pequeñas (1 nm - 20 nm) inversas par 35 encapsular agentes inmunomoduladores hidrófilos y mezclarlos con copolímeros biodegradables para formular los núcleos de nanotransportadores poliméricos.

Debe entenderse que las composiciones de la invención pueden prepararse de cualquier manera adecuada. La selección de un método adecuado puede requerir atención a las propiedades de los restos concretos que se están asociando.

40 Si se desea, se pueden usar varios métodos para separar nanotransportadores de vacunas con un agente inmunomodulador unido, un resto de direccionamiento, un agente inmunoestimulador, y o una nanopartícula de nanotransportadores de vacunas a los cuales el agente inmunomodulador, un resto de direccionamiento, el agente inmunoestimulador, y/o la nanopartícula no han llegado a unirse, o para separar nanotransportadores de vacunas 45 que tienen diferentes cantidades de agentes inmunomoduladores, restos de direccionamiento, agentes inmunoestimuladores y/o nanopartículas unidos al anterior. Por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, la electroforesis en gel de agarosa, o la filtración se pueden usar para separar poblaciones de nanotransportadores de vacunas que tienen diferentes cantidades de entidades unidas al anterior y/o para separar nanotransportadores de vacunas de otras entidades. Algunos métodos incluyen la exclusión por tamaño o la cromatografía de intercambio 50 aniónico.

En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas inventivos se fabrican en condiciones estériles. Esto puede garantizar que las vacunas resultantes sean estériles y no infecciosas, aumentando de esta manera la seguridad cuando se comparan con vacunas vivas. Esto proporciona una medida de seguridad valiosa, especialmente cuando los sujetos que reciben vacunas tienen defectos inmunitarios, y padecen la infección, y/o son 55 susceptibles a la infección.

En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas inventivos se pueden liofilizar y almacenar en suspensión o como polvo liofilizado dependiendo de la estrategia de formulación para periodos prolongados sin pérdida de actividad. 60

Aplicaciones

Las composiciones descritas en este documento pueden utilizarse para inducir, potenciar, dirigir, o redirigir una respuesta inmunitaria. Las composiciones descritas en el presente documento se pueden usar para la profilaxis y/o el tratamiento de cualquier cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad metabólica, enfermedad degenerativa, 65

enfermedad autoinmunitaria, enfermedad alérgica, enfermedad inflamatoria, enfermedad inmunológica, u otro trastorno y/o dolencia. Las composiciones descritas en el presente documento se pueden usar para el tratamiento de una adicción, tal como la adicción a cualquiera de las sustancias adictivas descritas en el presente documento. Las composiciones descritas en el presente documento se pueden usar para la profilaxis y/o el tratamiento de cualquier dolencia que sea el resultado de la exposición a una toxina, sustancia peligrosa, toxina ambiental, u otro agente nocivo. Los sujetos incluyen, pero sin limitación, seres humanos y/u otros primates; mamíferos, incluyendo mamíferos de interés comercial tales como ganado vacuno, cerdos, caballos, ovejas, gatos, y/o perros; y/o aves, incluyendo aves de interés comercial tales como pollos, patos, gansos y/o pavos.

5
10 En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas de acuerdo con la presente invención se pueden usar para tratar, aliviar, mejorar mitigar, retrasar el inicio de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de, y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno, y/o dolencia. En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas inventivas se pueden usar para tratar, aliviar, mejorar mitigar, retrasar el inicio de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de, y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de infección microbiana (por ejemplo, una infección bacteriana, infección fúngica, infección vírica, infección parasítica, etc.).

15
20 En un aspecto de la invención, se proporcionan nanotransportadores para la profilaxis y/o el tratamiento de una enfermedad, trastorno o dolencia (por ejemplo, una infección microbiana). En algunas realizaciones, la profilaxis y/o el tratamiento de la enfermedad, trastorno o dolencia comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de nanotransportadores de vacunas inventivas a un sujeto que lo necesita, en cantidades tales y durante un tiempo tal como sea necesario para conseguir el resultado deseado. En determinadas realizaciones de la presente invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un nanotransportador de vacunas inventivo es que la cantidad eficaz para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el inicio de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de, y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas de características de la infección microbiana. En algunas realizaciones, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad eficaz para modular el sistema inmunitario. Dicha cantidad puede ser una cantidad inmunógena, es decir, una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmunitaria detectable en un sujeto, por ejemplo, una respuesta de anticuerpos detectable y/o una respuesta de linfocitos T detectable.

30
35 Los protocolos profilácticos y/o terapéuticos implican administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más transportadores de vacunas inventivos a un sujeto sano (por ejemplo, un sujeto que no muestra ningún síntoma de una infección microbiana y/o quien no ha recibido un diagnóstico de enfermedad microbiana; un sujeto que aún no se ha expuesto a una toxina, un sujeto que aún no ha ingerido una sustancia adictiva o que crea dependencia, etc.). Por ejemplo, los individuos sanos se pueden vacunar usando uno o varios nanotransportadores de vacunas inventivos antes de desarrollar la infección microbiana, la exposición a la toxina, sustancia adictiva, sustancia que crea dependencia, etc. y/o el inicio de los síntomas relacionados con la misma; a individuos en riesgo (por ejemplo, pacientes expuestos a individuos que padecen una infección microbiana, que viajan a una localización donde los microbios/toxinas son frecuentes; etc.) se pueden tratar sustancialmente simultáneamente con (por ejemplo, al cabo de 48 horas, al cabo de 24 horas o al cabo de 12 horas) del inicio de los síntomas y/o la exposición/ingestión. Por supuesto, los individuos de los que se sabe que tienen una infección microbiana, han estado expuestos a una toxina, o han ingerido una sustancia adictiva o que crea dependencia pueden recibir tratamiento en cualquier momento.

40
45 Los protocolos profilácticos y/o terapéuticos implican administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más transportadores de vacunas inventivos a un sujeto de tal manera que se modula una respuesta inmunitaria para linfocitos B y linfocitos T.

50 Al combinar agentes inmunomoduladores seleccionados con moléculas de direccionamiento y agentes inmunoestimuladores para diferentes APC, las respuestas inmunitarias (por ejemplo, respuestas efectoras) se pueden adaptar para que produzcan preferentemente el tipo de respuesta inmunitaria más deseable para una determinada indicación, *por ejemplo*, respuesta humoral, respuesta de linfocitos T tipo 1, respuesta de linfocitos T tipo 2, respuesta de linfocitos T citotóxicos, y/o una combinación de estas respuestas. De este modo, se puede usar la misma plataforma para una amplia gama de diferentes aplicaciones clínicas, incluidas las vacunas profilácticas a un hospedador de patógenos, pero también como inmunoterapia para enfermedades existentes, tales como infecciones, alergias, enfermedades autoinmunitarias, y/o cáncer.

55
60 Los cánceres incluyen, pero no se limitan a cáncer del tracto biliar; cáncer de cerebro; cáncer de mama; cáncer de cuello de útero; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer de endometrio; cáncer de esófago; cáncer gástrico; neoplasias intraepiteliales; linfomas; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (por ejemplo, microcítico y no microcítico); melanoma; neuroblastomas; cáncer oral; cáncer de ovario; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer rectal; sarcomas; cáncer de piel; cáncer testicular; cáncer de tiroides; y cáncer renal, así como otros carcinomas y sarcomas.

65 Las enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide, fiebre reumática, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus insulino dependiente, diabetes mellitus, diabetes juvenil, diabetes autoinmunitaria espontánea, gastritis, gastritis

atrófica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, tiroiditis, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis autoinmune, insulinitis, ooforitis, orquitis, uveitis, uveitis facogénica, esclerosis múltiple, miastenia grave, mixedema primario, tirotoxicosis, anemia perniciosa, anemia hemolítica autoinmunitaria, enfermedad de Addison, esclerodermia, síndrome de Goodpasture, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Graves, glomerulonefritis, psoriasis, pénfigo vulgar, penfigoide, oftalmia del simpático, púrpura trombocitopénica idiopática, leucopenia idiopática, síndrome de Sjögren, granulomatosis de Wegener, poli/dermatomiositis o lupus eritematoso sistémico.

Las enfermedades alérgicas incluyen, pero sin limitación, eccema, rinitis alérgica o coriza, fiebre del heno, conjuntivitis, asma, urticaria (ronchas), reacciones alérgicas tóxicas, alergias alimentarias, anafilaxia, dermatitis atópica, reacciones de hipersensibilidad y otras dolencias alérgicas. La reacción alérgica puede ser el resultado de una reacción inmunitaria a cualquier alérgeno incluyendo pero sin limitación, polvo común, polen, plantas, caspa de animales, fármacos, alérgenos alimentarios, veneno de insectos, virus, o bacterias.

Las enfermedades o trastornos inflamatorios incluyen, por ejemplo, enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquiectasias, colecistitis crónica, tuberculosis, tiroiditis de Hashimoto, septicemia, sarcoidosis, silicosis y otras neumoconiosis, y un cuerpo extraño implantado en una herida, pero no de forma tan limitada. Como se usa en el presente documento, el término "sepsia" se refiere a un síndrome clínico bien reconocido asociado con una respuesta inflamatoria sistémica del hospedador a la invasión microbiana. El término "sepsia" tal como se usa en el presente documento se refiere a una dolencia que está señalada de forma típica por fiebre o hipotermia, taquicardia y taquicardia y taquipnea y, en casos graves, puede progresar a hipotensión, disfunción de órganos, e incluso la muerte.

Composiciones farmacéuticas

La presente invención proporciona novedosas composiciones que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más nanotransportadores de vacunas y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden nanotransportadores de vacunas inventivos y/o cualquiera de sus composiciones descritas en el presente documento. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender opcionalmente una o más sustancias terapéuticamente activas adicionales. De acuerdo con algunas realizaciones, se proporciona administrar una composición farmacéutica que comprende composiciones inventivas a un sujeto que lo necesita. En algunas realizaciones, las composiciones inventivas se administran a seres humanos. Para los fines de la presente invención, la frase "principio activo" se refiere generalmente a un nanotransportador de vacunas inventivo que comprende al menos un agente inmunomodulador y que comprende opcionalmente uno o más restos de direccionamiento, y/o nanopartículas.

Aunque las descripciones de las composiciones farmacéuticas proporcionan en el presente documento están principalmente dirigidas a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para su administración a seres humanos, el experto en la materia entenderá que dichas composiciones son generalmente adecuadas para su administración a todo tipo de animales. La modificación de composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a seres humanos para volver las composiciones adecuadas para su administración a diferentes animales es bien conocido, y el farmacéutico veterinario normalmente experto puede diseñar y/o llevar a cabo tales modificaciones con una pequeña, en caso de haberlo, experimentación. Los sujetos para los que se pueden contemplar las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, pero sin limitación, seres humanos y/u otros primates; mamíferos, incluyendo mamíferos de interés comercial tales como ganado vacuno, cerdos, caballos, ovejas, gatos, y/o perros; y/o aves, incluyendo aves de interés comercial tales como pollos, patos, gansos y/o pavos.

Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden preparar mediante cualquier método conocido o desarrollado en el futuro en la técnica de farmacia. En general, dichos métodos de preparación incluyen la etapa de asociar el principio activo con uno o más excipientes y/o uno o más ingredientes auxiliares adicionales, y a continuación, si es necesario y/o deseable, la conformación y/o el envasado del producto en una forma farmacéutica monodosis y multidosis.

Una composición farmacéutica de la invención se puede preparar, envasar, y/o vender a granel, como dosis unitaria sencilla, y/o como una pluralidad de dosis unitarias sencillas. Como se usa en el presente documento, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del principio activo. La cantidad de principio activo es generalmente igual a la dosis del principio activo, que se administraría a un sujeto y/o una fracción conveniente de dicha dosificación tal como, por ejemplo, una mitad o un tercio de dicha dosis.

Las cantidades relativas del principio activo, el uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, y/o cualesquiera ingredientes adicionales en una composición farmacéutica de la invención puede variar, dependiendo de la identidad, tamaño, y/o estado del sujeto tratado, y adicionalmente dependiente de la vía por la que se va a administrar la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre un 0,1 % y 100 % (p/p) de principio activo.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable, que, como se usa en el presente documento, incluyen cualquier y todos los disolventes, medios de dispersión, diluyentes, u otros vehículos líquidos, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea adecuado para la forma de dosificación concreta deseada. Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21a Edición, A. R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) divulga varios excipientes usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de los mismos. Salvo en la medida que cualquier excipiente convencional sea incompatible con una sustancia o sus derivados, tal como mediante la producción de cualquier efecto biológico no deseado o la interacción de otro modo perjudicial con cualquier otro componente(s) de la composición farmacéutica, su uso se contempla dentro del alcance de la presente invención.

En algunas realizaciones, el excipiente farmacéuticamente aceptable es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % puro. En algunas realizaciones, el excipiente se autoriza para su uso en humanos y para uso veterinario. En algunas realizaciones, el excipiente está autorizado por la United States Food and Drug Administration. En algunas realizaciones, el excipiente es de calidad farmacéutica. En algunas realizaciones, el excipiente cumple las normas de la United States Pharmacopoeia (USP), la European Pharmacopoeia (EP), la British Pharmacopoeia, y/o la International Pharmacopoeia.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables usados en la fabricación de las composiciones farmacéuticas incluyen, pero sin limitación, diluyentes inertes, agentes de dispersión y/o granulación, tensioactivos y/o emulsionantes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, conservantes, agentes tamponadores, agentes y/o aceites lubricantes. Dichos excipientes pueden incluirse opcionalmente en las formulaciones inventivas. Los excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorio, agentes colorantes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes, y agentes perfumantes, pueden estar presentes en la composición, según el juicio del experto en formulación.

Los diluyentes ilustrativos incluyen, pero sin limitación, carbonato de calcio, carbonato de sodio, fosfato de calcio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, hidrógeno fosfato de calcio, lactosa fosfato de sodio, sacarosa, celulosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, sorbitol, inositol, cloruro sódico, almidón seco, almidón de maíz, azúcar en polvo, etc., y/o sus combinaciones

Los agentes de granulación y/o dispersantes incluyen, pero sin limitación, almidón de patata, almidón de maíz, almidón de tapioca, glicolato de almidón sodio, arcillas, ácido algínico, goma guar, pulpa de cítricos, agar, bentonita, celulosa y productos de madera, esponja natural, resinas de intercambio catiónico, carbonato de calcio, silicatos, carbonato de sodio, poli(vinilpirrolidona) reticulada (crospovidona), carboximetilalmidón sodio (glicolato de almidón sódico), carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio reticulada (croscarmelosa), metilcelulosa, almidón pregelatinizado (almidón 1500), almidón microcristalino, almidón insoluble en agua, carboximetilcelulosa de calcio, silicato de aluminio y magnesio (Veegum), lauril sulfato sódico, compuestos de amonio cuaternario, etc., y/o sus combinaciones.

Los agentes tensioactivos y/o emulsionantes ilustrativos incluyen, pero sin limitación, emulsionantes naturales (por ejemplo, acacia, agar, ácido algínico, alginato de sodio, tragacanto, condruj, colesterol, xantana, pectina, gelatina, yema de huevo, caseína, lanolina, colesterol, cera, y lecitina), arcillas coloidales (por ejemplo, bentonita [silicato de aluminio] y Veegum [silicato de aluminio y magnesio]), derivados de aminoácidos, de cadena larga, alcoholes de alto peso molecular (por ejemplo, alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol oleílico, monoestearato de triacetina, diestearato de etilenglicol, monoestearato de glicerilo, y monoestearato de propilenglicol, poli(alcohol vinílico), carbómeros (por ejemplo, carboxipolimetileno, poli(ácido acrílico), polímero de ácido acrílico y polímero de carboxivinilo), carragenato, derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, celulosa en polvo, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, metilcelulosa), ésteres de ácidos grasos de sorbitán (por ejemplo, monopalmitato de sorbitán polioxietileno [Tween®20], sorbitán polioxietileno [Tween®60], monoleato de sorbitán polioxietileno [Tween®80], monopalmitato de sorbitán [Span®40], monoestearato de sorbitán [Span®60], triestearato de sorbitán [Span®65], monooleato de glicerilo, monooleato de sorbitán [Span®80]), ésteres polioxietilenados (por ejemplo, monoestearato polioxietileno [Myrj®45], aceite de ricino polioxietileno, aceite de ricino polioxietileno, estearato polioxietileno, y Solutol), ésteres de ácido graso de sacarosa, ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol (por ejemplo, Cremophor®), éteres polioxietilenados, (por ejemplo, lauril éter polioxietileno [Brij®30]), poli(vinilpirrolidona), monolaurato de dietilenglicol, oleato de trietanolamina, oleato de sodio, oleato de potasio, oleato de etilo, ácido oleico, laurato de etilo, lauril sulfato sódico, Pluronic F 68, Poloxámero 188, bromuro de cetrimonio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de benzalconio, docusato de sodio, etc. y/o sus combinaciones.

Los agentes de unión ilustrativos incluyen, pero sin limitación, almidón (por ejemplo, almidón de maíz y pasta de almidón); gelatina; azúcares (por ejemplo, sacarosa, glucosa, dextrina, dextrina, melazas, lactosa, lactitol, manitol); gomas naturales y sintéticas (por ejemplo, acacia, alginato de sodio, extracto de musgo de Irlanda, goma panwar, goma ghatti, mucílago de cáscara de isapal, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, celulosa microcristalina, acetato de celulosa, poli(vinilpirrolidona),

silicato de aluminio y magnesio (Veegum), y arabolaractano de alerce); alginatos; poli(óxido de etileno); polietilenglicol; sales de calcio inorgánicas; ácido silícico; polimetacrilatos; ceras; agua; alcohol; *etc.*; y combinaciones de los mismos.

- 5 Los conservantes ilustrativos pueden incluir antioxidantes, agentes quelantes, agentes antimicrobianos, conservantes antifúngicos, conservantes de alcohol, conservantes ácidos, y otros conservantes. Los antioxidantes ilustrativos incluyen, pero sin limitación, alfa tocoferol, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, monotioglicerol, metabisulfito de potasio, ácido propiónico, galato de propilo, ascorbato sódico, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, y sulfito de sodio. Los agentes quelantes ilustrativos incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico monohidrato, edeatato disódico, edetato dipotásico, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, ácido fosfórico, edetato de sodio, ácido tartárico, y edetato trisódico. Los conservantes antimicrobianos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, bronopol, cetrimida, cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina, clorobutanol, clorocresol, cloroxilenol, cresol, alcohol etílico, glicerina, hexetidina, imidurea, fenol, fenoxietanol, feniletil alcohol, nitrato de fenilmercurio, propilenglicol, y timerosal. Los conservantes antifúngicos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, butil parabeno, metil parabeno, etil parabeno, propil parabeno, ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, benzoato de potasio, sorbato de potasio, benzoato de sodio, propionato de sodio, y ácido sórbico. Los conservantes de alcohol ilustrativos incluyen, pero sin limitación, etanol, polietilenglicol fenol, compuestos fenólicos, bisfenol, clorobutanol, hidroxibenzoato, y alcohol fenilefílico. Los conservantes ácidos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, vitamina A, vitamina C, vitamina E, beta-caroteno, ácido cítrico, ácido acético, ácido deshidroacético, ácido ascórbico, ácido sórbico, y ácido fítico. Otros conservantes incluyen, pero sin limitación, tocoferol, acetato de tocoferol, mesilato de detersoxima, cetrimida, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), etilendiamina, lauril sulfato de sodio (SLS), lauril éter sulfato de sodio (SLS), bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de potasio, metabisulfito de potasio, Glydant Plus®, Phenonip®, metilparabeno, Germall 115, Germaben II, Neolone™, Kathon™, y Euxyl®. En determinadas realizaciones, el conservante es un antioxidante. En otras realizaciones, el conservante es un agente quelante.

- Los agentes tamponantes ilustrativos incluyen, pero sin limitación, soluciones de tampón citrato, soluciones de tampón acetato, soluciones de tampón fosfato, cloruro de amonio, carbonato de calcio, cloruro de calcio, citrato de calcio, glubionato de calcio, gluceptato de calcio, gluconato de calcio, ácido D-glucónico, glicerofosfato de calcio, lactato de calcio, ácido propanoico, levulinato de calcio, ácido pentanoico, fosfato de calcio dibásico, ácido fosfórico, fosfato de calcio tribásico, hidróxido de fosfato de calcio, acetato de potasio, cloruro de potasio, gluconato de potasio, mezclas potásicas, fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio monobásico, mezclas de fosfato de potasio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro sódico, citrato de sodio, lactato sódico, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, mezclas de fosfato de sodio, trometamina, hidróxido de magnesio, hidróxido de aluminio, ácido alginico, agua apirógena, solución salina isotónica, solución de Ringer, alcohol etílico, *etc.*, y/o sus combinaciones.

- Los agentes lubricantes ilustrativos incluyen, pero sin limitación, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, sílice, talco, malta, behenato de glicerilo, aceites vegetales hidrogenados, polietilenglicol benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro sódico, leucina, lauril sulfato de magnesio, lauril sulfato sódico, *etc.*, y/o sus combinaciones.

- Los aceites ilustrativos incluyen, pero sin limitación, aceite de almendras, aceite de almendras de albaricoque, aguacate, babasú, bergamota, semillas de grosella negra, borraja, enebro de miera, camomila, colza, alcaravea, carnaúba, ricino, canela, manteca de cacao, coco, hígado de bacalao, café, maíz, semillas de algodón, emú, eucalipto, onagra, pescado, semillas de lino, geraniol, calabaza, pepitas de uva, avellanas, hisopo, miristato de isopropilo, jojoba, nuez de kukui, lavandina, lavanda, limón, litsea cubeba, nuez de macadamia, malva, semillas de mango, semillas de hierba de la pradera, visón, nuez moscada, de oliva, naranja, de reloj anaranjado, palma, nuez de palma, nuez de melocotón, cacahuete, semillas de amapola, semillas de calabaza, colza, salvado de arroz, romero, cártamo, madera de sándalo, camelia sasquana, aceite especiado, espino cerval, sésamo, manteca de karité, silicona, soja, girasol, árbol del té, cardo, camelia, vetiver, avellana y aceites de germen de trigo. Los aceites ilustrativos incluyen, pero sin limitación, estearato de butilo, triglicérido caprílico, triglicérido cáprico, ciclometicona, sebacato de dietilo, dimeticona 360, miristato de isopropilo, aceite mineral, octildodecanol, alcohol oleílico, aceite de silicona, y sus combinaciones.

- Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen, pero sin limitación, emulsiones farmacéuticamente aceptables, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los principios activos, la forma farmacéutica líquida puede comprender diluyentes inertes usados habitualmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, de semilla de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes suspensores, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes. En determinadas realizaciones para la administración

parenteral, los nanotransportadores de vacunas de la invención se mezclan con agentes solubilizantes como Cremophor®, alcoholes, aceites, aceites modificados, glicoles, polisorbatos, ciclodextrinas, polímeros, y sus combinaciones.

5 Las formulaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes suspensores. Una preparación inyectable estéril puede ser una solución inyectable estéril, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución de cloruro sódico isotónica. Además, aceites fijos estériles, se usan convencionalmente en forma de un disolvente o un medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, se usan ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de los inyectables.

15 Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

20 Para prolongar el efecto de un fármaco, es a menudo deseable ralentizar la absorción del fármaco mediante inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende por tanto de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Como alternativa, la absorción retardada de una forma de fármaco administrada parenteralmente se puede lograr disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso.

25 Las composiciones para administración rectal o vaginal son de forma típica supositorios que pueden prepararse mezclando los nanotransportadores de vacunas de la presente invención con excipientes adecuados no irritantes, tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera para supositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y por lo tanto se derretirán en el recto o en la cavidad vaginal y liberarán el principio activo.

30 Las formas farmacéuticas sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas farmacéuticas sólidas, el principio activo se mezcla con al menos un excipiente inerte farmacéuticamente aceptable, tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o a) cargas o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polvinipirrolidona, sacarosa, y acacia, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes disgregantes tales como agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, algunos silicatos, y carbonato de sodio, e) agentes retardantes de la solución, tales como parafina, f) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y bentonita arcilla, e i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, y sus mezclas. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma farmacéutica puede comprender agentes tamponadores.

45 Pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas farmacéuticas sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y envolturas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Pueden comprender opcionalmente agentes opacificantes y también puede ser de una composición tal que liberen a el(los) ingrediente(s) activo(s) únicamente, o bien, preferentemente, en una parte determinada del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

55 Los principios activos pueden estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes, tal como se ha indicado anteriormente. Las formas farmacéuticas sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y envolturas, tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de control de la liberación y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. En dichas formas farmacéuticas sólidas, el principio activo se puede premezclar con al menos un diluyente inerte como sacarosa, lactosa o almidón. Dichas formas farmacéuticas pueden comprender, como es habitual, sustancias adicionales distintas de los diluyentes inertes, *por ejemplo*, lubricantes de compresión y otros adyuvantes para la compresión, tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas farmacéuticas pueden comprender agentes tamponadores. Pueden comprender opcionalmente agentes opacificantes y también puede ser de una composición tal que liberen a el(los) ingrediente(s) activo(s) únicamente, o bien, preferentemente, en una parte determinada del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

Las formas farmacéuticas para uso tópico y/o administración transdérmica de nanotransportadores de vacunas de acuerdo con la presente invención pueden incluir pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, inhaladores y/o parches. En general, el principio activo se mezcla en condiciones estériles con un excipiente farmacéuticamente aceptable y cualesquiera conservantes y/o tampones necesarios, según se requiera. Además, la presente invención contempla el uso de parches transdérmicos, que frecuentemente tienen la ventaja añadida de proporcionar un suministro controlado de un principio activo al organismo. Dichas formas farmacéuticas se puede preparar, por ejemplo, disolviendo y/o dispersando el principio activo en el medio correcto. De forma alternativa o adicional, la velocidad se puede controlar tanto proporcionando una membrana de control de la velocidad y/o dispersando el principio activo en una matriz polimérica y/o gel.

Los dispositivos adecuados para administrar las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento por vía intradérmica incluyen los dispositivos de aguja corta tales como los que se describen en las patentes de Estados Unidos 4.886.499; 5.190.521; 5.328.483; 5.527.288; 4.270.537; 5.015.235; 5.141.496; y 5.417.662. Las composiciones intradérmicas se pueden administrar mediante dispositivos que limiten la longitud de penetración eficaz de una aguja dentro de la piel, tales como los que se describen en la publicación PCT WO 99/34850 y sus equivalentes funcionales. Son adecuados los dispositivos de inyección de chorro que administran vacunas líquidas a la dermis mediante un inyector de chorro líquido y/o mediante una aguja que perfora el estrato córneo y produce un chorro que alcanza la dermis. Los dispositivos de inyección de chorro se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 5.480.381; 5.599.302; 5.334.144; 5.993.412; 5.649.912; 5.569.189; 5.704.911; 5.383.851; 5.893.397; 5.466.220; 5.339.163; 5.312.335; 5.503.627; 5.064.413; 5.520.639; 4.596.556; 4.790.824; 4.941.880; 4.940.460; y en la Publicaciones PCT WO 97/37705 y WO 97/13537. Son adecuados los dispositivos de administración balística de polvo/partículas que usan gas comprimido para acelerar la vacuna en forma de polvo a través a través de las capas exteriores de la piel hasta alcanzar la dermis. De forma alternativa o adicional, se pueden usar jeringas convencionales según el método clásico de Mantoux de administración intradérmica.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica incluyen, pero sin limitación, preparaciones líquidas y/o semilíquidas tales como linimentos, lociones, emulsiones de aceite en agua y/o de agua en aceite tales como cremas, pomadas y/o pastas, y/o soluciones y/o suspensiones. Las formulaciones que se pueden administrar por vía tópica, por ejemplo, comprenden de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % (p/p) de principio activo, aunque la concentración del principio activo puede ser tan alta como el límite de solubilidad del principio activo en el disolvente. Las formulaciones para administración tópica pueden comprender además uno o más de los ingredientes adicionales descritos en el presente documento.

Una composición farmacéutica de la invención se puede preparar, envasar, y/o comercializar en una formulación adecuada para administración pulmonar a través de la cavidad bucal. Dicha formulación puede comprender partículas secas que comprenden el principio activo y que tienen un diámetro comprendido en el intervalo de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente 7 μm o de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 6 μm . Dichas composiciones están convenientemente en forma de polvos secos para su administración usando un dispositivo que comprende un depósito de polvo seco al que se puede dirigir una corriente de propulsor para dispersar el polvo y/o usar una recipiente dispensador de disolvente/polvo autopropulsado tal como un dispositivo que comprende el principio activo disuelto y/o suspendido en un propulsor de bajo punto de ebullición en un recipiente precintado. Dichos polvos comprenden partículas en las que al menos el 98 % de las partículas en peso tienen un diámetro superior a 0,5 μm y al menos el 95 % de las partículas en número tienen un diámetro inferior a 7 μm . Como alternativa, al menos el 95 % de las partículas en peso tienen un diámetro superior a 1 μm y al menos el 90 % de las partículas en número tienen un diámetro inferior a 6 μm . Las composiciones de polvo seco pueden incluir un diluyente en forma de polvo fino como azúcar, y se proporciona convenientemente en una forma farmacéutica unitaria.

Los propulsores de bajo punto de ebullición por lo general incluyen propulsores líquidos que tienen un punto de ebullición inferior a 65 °F (18,3 °C) a presión atm osférica. Por lo general, el propulsor puede constituir del 50 % al 99,9 % (p/p) de la composición, y el principio activo puede constituir del 0,1 % al 20 % (p/p) de la composición. El propulsor puede comprender además ingredientes adicionales tales como un tensioactivo no iónico líquido y/o un tensioactivo aniónico sólido y/o un diluyente sólido (que puede tener un tamaño de las partículas del mismo orden de magnitud que las partículas que comprenden el principio activo).

Las composiciones farmacéuticas de la invención formulada para administración pulmonar pueden proporcionar el principio activo en forma de gotículas de una solución y/o suspensión. Dichas formulaciones pueden prepararse, envasarse y/o comercializarse en forma de soluciones y/o suspensiones alcohólicas acuosas y/o diluidas, opcionalmente estériles, que comprenden el principio activo, y se pueden administrar convenientemente usando cualquier dispositivo de nebulización y/o atomización. Dichas formulaciones pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales incluyendo, pero no limitándose a, un agente aromatizante tal como sacarina de sodio, un aceite volátil, un agente tamponador, un agente tensioactivo, y/o un conservante tal como hidroxibenzoato de metilo. Las gotículas proporcionadas por esta vía de administración pueden tener un diámetro promedio comprendido en el intervalo de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 200 μm .

Las formulaciones descritas en el presente documento que son útiles para administración pulmonar son útiles para administración intranasal de una composición farmacéutica de la invención. Otra formulación adecuada para su administración intranasal es un polvo grueso que comprende el principio activo y que tiene un diámetro promedio de aproximadamente 0,2 μm a aproximadamente 500 μm . Dicha formulación se administra de la forma en la que se toma rapé, es decir, por inhalación rápida a través de las fosas nasales desde un envase con el polvo sujetado cerca de la nariz.

Las formulaciones adecuadas para administración nasal, por ejemplo, comprenden desde aproximadamente tan solo un 0,1 % (p/p) y tanto como un 100 % (p/p) del principio activo, y puede comprender uno o más de los ingredientes adicionales descritos en el presente documento. Una composición farmacéutica de la invención se puede preparar, envasar, y/o comercializar en una formulación adecuada para administración bucal. Dichas formulaciones pueden estar, por ejemplo, en forma de comprimidos y/o gominolas fabricadas usando métodos convencionales, y pueden tener, por ejemplo, 0,1 % al 20 % (p/p) de principio activo, siendo el resto una composición que se puede disolver y/o disgregar por vía oral y, opcionalmente, uno o más de los ingredientes adicionales descritos en el presente documento. Como alternativa, las formulaciones adecuadas para administración bucal pueden comprender un polvo y/o una solución y/o suspensión aerosolizada y/o atomizada que comprende el principio activo. Dichas formulaciones en polvo, aerosolizadas, y/o en aerosol, cuando se dispersan, pueden tener un tamaño promedio de partículas y/o gotículas en el intervalo de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 200 μm , y puede comprender además uno o más de los ingredientes adicionales descritos en el presente documento.

Una composición farmacéutica de la invención se puede preparar, envasar, y/o comercializar en una formulación adecuada para administración oftálmica. Dichas formulaciones pueden estar, por ejemplo, estar en forma de colirios incluyendo, por ejemplo, una solución y/o suspensión al 0,1 %/1,0 % (p/p) del principio activo en un excipiente líquido acuoso u oleoso. Dichas gotículas pueden también comprender agentes tamponantes, sales, y/o uno o más de los ingredientes adicionales descritos en el presente documento. Otras formulaciones que se pueden administrar por vía oftálmica que son útiles incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina y/o como preparación liposómica. Las gotas óticas y/o los colirios se consideran comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

Consideraciones generales sobre la formulación y/o fabricación de agentes farmacéuticos se pueden encontrar, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21^a ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

Administración

En algunas realizaciones, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de un nanotransportador de vacunas inventivo a un paciente y/o animal antes, simultáneamente, y/o después de diagnosticar una enfermedad, trastorno, y/o dolencia. En algunas realizaciones, se administra una cantidad terapéutica de una composición inventiva a un paciente y/o animal antes de, simultáneamente, y/o después de los síntomas de una enfermedad, trastorno, y/o dolencia. En algunas realizaciones, la cantidad del nanotransportador de vacunas es suficiente para tratar, aliviar, mejorar mitigar, retrasar el inicio de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de, y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de la enfermedad, trastorno, y/o dolencia. En algunas realizaciones, la cantidad de nanotransportador de vacunas es suficiente para provocar una respuesta inmunitaria detectable en un sujeto. En algunas realizaciones, la cantidad de nanotransportador de vacunas es suficiente para provocar una respuesta de anticuerpos detectable en un sujeto. En algunas realizaciones, la cantidad de nanotransportador de vacunas es suficiente para provocar una respuesta de linfocitos T detectable en un sujeto. En algunas realizaciones, la cantidad de nanotransportador de vacunas es suficiente para provocar una respuesta de anticuerpos y linfocitos T detectable en un sujeto. En algunas realizaciones, una ventaja de los nanotransportadores proporcionados es que los nanotransportadores pueden provocar respuestas potentes con una concentración mucho menor de antígeno de la necesaria con una vacuna convencional.

Las composiciones se pueden administrar usando cualquier cantidad y cualquier ruta de administración eficaz para el tratamiento. La cantidad exacta necesaria variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad, y estado general del sujeto, la gravedad de la infección, la composición particular, su modo de administración, su modo de actividad, y similares. Las composiciones de la invención se formulan de forma típica en una forma farmacéutica unitaria por facilidad de administración y uniformidad de la dosis. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de las composiciones de la presente invención se decidirá por el médico a cargo del tratamiento dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel específico de dosificación terapéuticamente eficaz para cualquier sujeto u organismo concreto dependerá de varios factores incluyendo el trastorno que se esté tratando y la severidad del trastorno; la actividad del principio activo específico utilizado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la alimentación del sujeto; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del principio activo específico utilizado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o a la vez con el principio activo específico usado; y factores similares bien conocidos en la práctica médica.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por cualquier ruta. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran mediante varias rutas, que incluye administración oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, subcutánea, intraventricular, transdérmica, intradérmica, rectal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, pomadas, cremas, y/o gotas), transdérmica, mucosa, nasal, bucal, enteral, sublingual; mediante instilación traqueal, instilación bronquial, y/o inhalación; y/o como una pulverización, pulverización nasal, y/o aerosol. Las rutas específicamente contempladas son la administración por vía oral, administración intravenosa, inyección intramuscular, y/o inyección subcutánea. En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas de la invención se administran por vía parenteral. En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas de la invención se administran por vía intravenosa. En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas de la invención se administran por vía oral.

Por lo general, la ruta de administración más adecuada dependerá de varios factores, entre los que se incluyen la naturaleza del nanotransportador de vacunas (por ejemplo, su estabilidad en el ambiente del tracto gastrointestinal), el estado del sujeto (por ejemplo, si el sujeto puede tolerar la administración por vía oral), etc. La invención abarca la administración de la composición farmacéutica inventiva mediante cualquier ruta adecuada teniendo en cuenta los probables avances en la ciencia de administración de fármacos.

En determinadas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas de la invención se pueden administrar en cantidades comprendidas de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de peso corporal del sujeto por día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado. La dosificación deseada puede administrarse tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, en días alternos, cada tres días, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas, o cada cuatro semanas. En determinadas realizaciones, la dosificación adecuada se puede administrar usando administraciones múltiples (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o más administraciones).

En algunas realizaciones, la presente invención abarca "cócteles terapéuticos" que comprenden poblaciones de nanotransportadores de vacunas inventivas. En algunas realizaciones, todos los nanotransportadores de vacunas dentro de una población de nanotransportadores de vacunas comprende una sola especie de resto direccionador que se puede unir a múltiples dianas (por ejemplo, se puede unir tanto a SCS-Mph como a FDC). En algunas realizaciones, diferentes nanotransportadores de vacunas dentro de una población de nanotransportadores de vacunas comprenden restos de direccionamiento diferentes, y todos los restos de direccionamiento diferentes se pueden unir a la misma diana. En algunas realizaciones, diferentes nanotransportadores de vacunas comprenden restos de direccionamiento diferentes, y todos los restos de direccionamiento diferentes se pueden unir a dianas diferentes. En algunas realizaciones, dichos agentes diferentes pueden asociarse con el mismo tipo de célula. En algunas realizaciones, dichas dianas diferentes pueden asociarse con diferentes tipos de células.

Terapias de combinación

Se apreciará que los nanotransportadores de vacunas y las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden emplear en tratamientos combinados. La combinación particular de tratamientos (terapéuticos o procesamientos) a utilizar en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los compuestos terapéuticos y/o procedimientos y el efecto terapéutico deseado a conseguir. Se apreciará que los tratamientos utilizados puedan conseguir un efecto deseado para el mismo fin (por ejemplo, como un nanotransportador de vacunas adecuado para vacunar contra un tipo particular de infección microbiana que se puede administrarse simultáneamente con otro agente útil para tratar la misma infección microbiana), o pueden conseguir efectos diferentes (por ejemplo, el control de cualesquiera efectos adversos atribuidos al nanotransportador de vacunas).

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar tanto solas o combinadas con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por "en combinación con", no se pretende implicar que los agentes deban administrarse al mismo tiempo y/o formularse para administrarse conjuntamente, aunque estos métodos de administración están comprendidos dentro del ámbito de la invención. Las composiciones se pueden administrar conjuntamente con, antes de, o posteriormente a, uno o más tratamientos o procedimientos médicos deseados. En general, cada agente se administrará a una dosis y/o con un calendario determinado para dicho agente. Además, la invención abarca la administración de composiciones farmacéuticas inventivas combinadas con agentes que mejoran su biodisponibilidad, reducen y/o modifican su metabolismo, inhiben su excreción, y/o modifican su distribución dentro del organismo.

La combinación particular de tratamientos (terapéuticos y/o procedimientos) a utilizar en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los compuestos terapéuticos y/o procedimientos y el efecto terapéutico deseado a conseguir. Se apreciará que los tratamientos utilizados puedan conseguir un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, un nanotransportador de vacunas inventivo se puede administrar simultáneamente

con otro agente terapéutico utilizado para tratar el mismo trastorno), y/o pueden conseguir efectos diferentes (por ejemplo, el control de cualesquiera efectos adversos atribuidos al nanotransportador de vacunas). En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas de la invención se administran con un segundo agente terapéutico que está aprobado por la U.S. Food and Drug Administration.

5 Se apreciará además que los principios terapéuticamente activos utilizados en combinación se pueden administrar conjuntamente en una sola composición o administrarse por separado en composiciones diferentes.

10 En general, se espera que los agentes utilizados en combinación se utilicen a niveles que no superan los niveles los que se utilizan individualmente. En algunas realizaciones, los niveles utilizados en combinación serán menores que los utilizados individualmente.

15 En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas de la invención se pueden administrar junto con un agente, incluyendo, por ejemplo, agentes terapéuticos, de diagnóstico y/o profilácticos. Los agentes ilustrativos a administrar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas, compuestos organometálicos, los ácidos nucleicos, proteínas (incluyendo proteínas multiméricas, complejos de proteína, etc.), péptidos, lípidos, hidratos de carbono, hormonas, metales, elementos y compuestos radioactivos, fármacos, vacunas, agentes inmunológicos, etc. y/o sus combinaciones.

20 En determinadas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas que retrasan el inicio y/o la progresión de una infección microbiana concreta pueden administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales que tratan los síntomas de la enfermedad. Para dar, pero a modo de ejemplo, tras exposición al virus de la rabia, los nanotransportadores que comprenden agentes inmunomoduladores de utilidad para la vacunación contra la rabia se pueden administrar combinados con uno o más agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de los síntomas del virus de la rabia (por ejemplo, agentes antipsicóticos de utilidad para el tratamiento de la paranoia que es un síntoma de infección por virus de la rabia).

25 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden nanotransportadores de vacunas inventivos comprenden menos de 50 % en peso, menos de 40 % en peso, menos de 30 % en peso, menos de 20 % en peso, menos de 15 % en peso, menos de 10 % en peso, menos de 5 % en peso, menos de 1 % en peso o menos de 0,5 % en peso de un agente a administrar.

30 En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas se administran junto con una o más moléculas pequeñas y/o compuestos orgánicos con actividad farmacéutica. En algunas realizaciones, el agente es un fármaco de uso clínico. En algunas realizaciones, el fármaco es un agente anticanceroso, un antibiótico, agente antiviral, agente anti-VIH, agente antiparasitario, agente antiprotzoario, anestésico, anticoagulante, inhibidor de una enzima, agente esteroideo, agente antiinflamatorio esteroideo o no esteroideo, antihistamina, agente inmunosupresor, agente antineoplásico, antígeno, una vacuna, anticuerpo, descongestivo, sedante, opiáceo, analgésico, antipirético, agente para el control de la natalidad, hormona, prostaglandina, agente progestacional, agente antiglaucoma, agente oftálmico, anticolinérgico, analgésico, antidepresivo, antipsicótico, neurotoxina, hipnótico, tranquilizante, anticonvulsivo, relajante muscular, agente anti Parkinson, antiespasmódico, agente de contracción muscular, bloqueante del canal, agente miótico, agente antisecretorio, agente antitrombótico, anticoagulante, anticolinérgico, agente bloqueante β -adrenérgico, diurético, agente activo cardiovascular, agente vasoactivo, agente vasodilatador, agente antihipertensivo, agente angiogénico, moduladores de las interacciones de la matriz celular-extracelular (por ejemplo, inhibidores del crecimiento celular y moléculas antiadhesión), inhibidores del ADN, ARN, o de la síntesis de proteínas, etc.

35 En determinadas realizaciones, un agente de molécula pequeña puede ser cualquier fármaco. En algunas realizaciones, el fármaco es aquel que se ha considerado y seguro y eficaz para su uso en seres humanos o animales por el organismo gubernamental o cuerpo regulador adecuados. Por ejemplo, la FDA relaciona los fármacos homologados para uso humano según 21 C.F.R. §§ 330.5, 331 a 361, y 440 a 460; la FDA relaciona los fármacos para el uso veterinario según 21 C.F.R. §§ 500 a 589. Todos los fármacos relacionados se consideran aceptables para el uso de acuerdo con la presente invención.

40 Puede encontrarse un listado más completo de las clases y fármacos específicos adecuados para el uso en la presente invención en *Pharmaceutical Drugs: Synthesis, Patents, Applications* de Axel Kleemann y Jurgen Engel, Thieme Medical Publishing, 1999 y el *Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, Ed. de Budavari et al., CRC Press, 1996.

45 En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas se administran en combinación con uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN funcionales, ADN funcionales, etc.) en una localización específica tal como un tejido, célula, o local subcelular. Por ejemplo, los nanotransportadores de vacunas inventivos que se usan para retrasar el inicio y/o la progresión de una infección microbiana concreta pueden administrarse en combinación con agentes de ARNi que reducen la expresión de las proteínas microbianas. Las propiedades moleculares de los ácidos nucleicos se describen en la sección anterior titulada "Restos de direccionamiento de ácido nucleico."

60

65

En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas se administran en combinación con una o más proteínas o péptidos. En algunas realizaciones, El agente que se va a administrar puede ser un péptido, hormona, eritropoyetina, insulina, citocina, antígeno para vacunación, etc. En algunas realizaciones, el agente que se va a administrar puede ser un anticuerpo y/o una de sus porciones características. Las propiedades moleculares de los cuales se describen en la sección anterior titulada “Restos de direccionamiento de proteínas.”

En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas se administran junto con uno o más hidratos de carbono, tales como un hidrato de carbono que está asociado a una proteína (por ejemplo, glucoproteína, proteoglicano, etc.). Un hidrato de carbono puede ser natural o sintético. Un hidrato de carbono puede ser también un hidrato de carbono natural derivatizado. En determinadas realizaciones, un hidrato de carbono puede ser un azúcar simple o complejo. En determinadas realizaciones, un hidrato de carbono es un monosacárido, incluyendo, aunque no de forma limitativa, glucosa, fructosa, galactosa, y ribosa. En determinadas realizaciones, un hidrato de carbono es un disacárido, incluyendo, aunque no de forma limitativa, lactosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, y celobiosa. En determinadas realizaciones, un hidrato de carbono es un polisacárido, incluyendo, aunque no de forma limitativa, celulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), metilcelulosa (MC), dextrina, dextrano, glucógeno, goma xantana, goma gellan, almidón, y pululano. En determinadas realizaciones, un hidrato de carbono es un alcohol azucarado, incluyendo, aunque no de forma limitativa, manitol, sorbitol, xilitol, eritritol, maltitol, y lactitol. Las propiedades moleculares de los hidratos de carbono se describen en la sección anterior titulada “Nanotransportadores de vacunas que comprenden hidratos de carbono.” hidratos de carbono.

En algunas realizaciones, los nanotransportadores de vacunas se administran junto con uno o más lípidos, tal como un lípido que está asociado a una proteína (por ejemplo, lipoproteína). Los lípidos ilustrativos que se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, aceites, ácidos grasos, ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados, ácidos grasos esenciales, ácidos grasos *cis*, ácidos grasos *trans*, glicéridos, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, hormonas, esteroides (por ejemplo, colesterol, ácidos biliares), vitaminas (por ejemplo, vitamina E), fosfolípidos, esfingolípidos, y lipoproteínas. Las propiedades moleculares de los lípidos se describen en la sección anterior titulada “Nanotransportadores de vacunas lipídicas.”

Los expertos en la materia reconocerán que esta es una lista ilustrativa, no exhaustiva de agentes terapéuticos, de diagnóstico y/o profilácticos que se pueden administrar junto con los nanotransportadores de vacunas de la presente invención. Cualquier agente terapéutico, de diagnóstico y/o profiláctico se puede administrar con los nanotransportadores de vacunas de acuerdo con la presente invención.

Kits

La invención proporciona varios kits que comprenden uno o más de los nanotransportadores de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona un kit que comprende un nanotransportador de vacunas inventivo e instrucciones para el uso. Un kit puede comprender múltiples nanotransportadores de vacunas diferentes. Un kit puede comprender cualquiera de numerosos componentes o reactivos adicionales en cualquier combinación.

Los kits incluyen normalmente instrucciones para usar los nanotransportadores de vacunas inventivos. Las instrucciones pueden comprender, por ejemplo, protocolos y/o describir condiciones para la producción de nanotransportadores de vacunas, la administración de los nanotransportadores de vacunas a un sujeto que lo necesita, etc. Los kits incluyen por lo general uno o más vasos o recipientes de tal forma que parte o todos los componentes y reactivos individuales pueden estar alojados de forma individual. Los kits también incluyen un medio para encerrar los recipientes individuales en un confinamiento relativamente cercano para venta comercial, *por ejemplo*, una caja de plástico, en la que instrucciones, material de envasado tal como Styrofoam, etc., se pueden incluir. Un identificador, *por ejemplo*, un código de barras, una etiqueta de identificación por radiofrecuencia (ID), etc., pueden estar presentes dentro o en el kit o en uno o más de los vasos o recipientes incluidos en el kit. Un identificador puede usarse, *por ejemplo*, para identificar unívocamente el kit con fines de control de calidad, control de inventario, seguimiento, movimiento entre estaciones de trabajo, etc.

Ejemplificación

Ejemplo 1: Macrófagos de seno subcapsular en ganglios linfáticos que no tienen virus transmitidos por linfa y presentación de los mismos a linfocitos B antivíricos

Materiales y métodos

Sumario del método

Los viriones VSV-IND y VSV-NJ se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo de células BSRT7 infectadas, y se usaron tanto sin modificar como marcados de forma fluorescente con Alexa-568 (rojo) o Alexa-488 (verde). Los virus fluorescentes usados para tomar imágenes de tejido se irradiaron mediante UV para evitar la generación de progenie no fluorescente. El marcado fluorescente o la irradiación mediante UV de las partículas VSV-IND no afectan a su antigenicidad o a su capacidad para desencadenar un flujo de calcio en células VI10YEN (no se

muestra). Tras la inyección del virus fluorescente a las almohadillas de las patas, se recogieron LN popliteales drenantes para su análisis mediante microscopio electrónico o se generaron secciones congeladas para inmunofluorescencia y microscopio confocal. Para obtener imágenes de linfocitos B transferidos de forma adoptiva en LN, las células VI10YEN y los linfocitos B naturales se marcaron de forma fluorescente y se transfirieron simultáneamente mediante inyección i.v. en ratones receptores naturales o mutantes. A las 18 horas, cuando los linfocitos B se han introducido en los folículos de linfocitos B, los ratones recibieron una inyección con VSV marcados o no marcados en la almohadilla plantar. En diferentes intervalos de tiempo después, los LN popliteales drenantes se observaron mediante MP-IVM o se recogieron para microscopio confocal o para citometría de flujo para analizar el estado de activación de linfocitos V específicos de virus y de control. En algunos experimentos, los macrófagos de la LN poplíteo se agotaron mediante inyecciones sc de CLL y los animales se usaron para experimentos 7-10 días después. MP-IVM, microscopio electrónico, inmunohistoquímica y citometría de flujo para varios marcadores se llevó a cabo sobre los LN con y sin tratamiento anterior de CLL. La propagación de VSV desde el sitio de inyección en la almohadilla plantar y el resto de órganos se evaluó infectando una cantidad definida de VSV vivos en las almohadillas de las patas seguido por la recogida de tejidos a dos o seis horas tras la inyección de VSV. Para medir los títulos víricos, los tejidos se homogeneizaron y se usaron en ensayos de placa. Se realizaron algunos experimentos de propagación del virus tras su canulación en el conducto torácico.

Ratones y anticuerpos

Ratones C57BL/6 y BALB/c se compraron a Taconic Farms (Germantown, NY). Los ratones VI10YEN (Hangartner et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 100:12883), $C3^{-/-}$ (Wessels et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92:11490), MHCII-EGFP (Boes et al., 2002, Nature, 418: 983), Act-EGFP (Wright et al., 2001, Blood, 97:2278), y DH-LMP2A (Casola et al., 2004, Nat. Immunol., 5:317) se reprodujeron en una instalación animal protegida de la Harvard Medical School y el Immune Disease Institute (IDI). Se generaron quimeras mediante irradiación de ratones Act(EGFP) con dos dosis de 650 rad y reconstitución con médula ósea de C57BL/6, y se permitió su reconstitución durante 8 semanas antes del uso. En algunos experimentos, Los macrófagos se agotaron SCS mediante inyecciones en la almohadilla plantar de 30 μ l de liposomas de clodronato (CLL), 7-10 días antes del experimento.

El clodronato fue un regalo de Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania. Otros reactivos para la preparación de liposomas fueron: Fosfatidilcolina (LIPOID E PC, Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Alemania) y colesterol (Sigma-Aldrich).

Los ratones se alojaron en condiciones específicas exentas de patógenos y de anticuerpos antiviricos de acuerdo con las directrices de los National Institutes of Health. Todos los procedimientos experimentales con animales fueron aprobados por el Institutional Animal Committees de la Harvard Medical School y el IDI.

Los anticuerpos se adquirieron de BD Biosciences (San Jose, CA), salvo anti-B220-Alexa647 (Invitrogen-Caltag), anti-LYVE-1 (Millipore-Upstate), anticuerpo de cabra contra Ig de APC de conejo (Invitrogen), anticuerpo de cabra contra GFP-FITC (Rockland), anticuerpo contra FITC-Alexa488 (Invitrogen), y Fab contra IgM-FITC (Jackson ImmunoResearch). Los siguientes anticuerpos se adquirieron de AbD-Serotec: anti-CD68-Alexa647, anticuerpo dirigido contra CD11b-Alexa647, F4/80-Alexa647, anticuerpo dirigido contra CD169-FITC (3D6). El anticuerpo contra idiotype 35.61 para la detección de BCR de VI10 en ratones VI10YEN (Hangartner et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 100:12883) se produjo a partir de sobrenadantes de hibridoma según procedimientos convencionales.

Citometría de flujo

El análisis de muestras de sangre mediante citometría de flujo se realizó mediante flebotomía retroorbital de ratones y lisis de eritrocitos con tampón ACK (NH_4Cl 0,15 M, KHCO_3 1 mM, EDTA 0,1 mM (sal disódica), pH 7,2). Suspensiones de una sola célula de LN y bazos para citometría de flujo se generaron mediante adelgazamiento cuidadoso de tejidos y digestión a 37°C durante 40 minutos en DMEM (Invitrogen-Gibco) en presencia de 250 μ g/ml de liberada CI (Roche) más 50 μ g/ml de ADNasa-I (Roche). Tras 20 minutos de digestión, las muestras se hicieron pasar intensamente a través de una aguja 18G para garantizar la disociación completa de los órganos. Todos los análisis de citometría de flujo se realizaron en tampón FACS que contiene PBS con EDTA 2 mM y PBS al 2 % (Invitrogen-GIBCO) en un FACScalibur (BD Pharmingen), y se analizó con el programa informático FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, OR). Para el flujo de calcio, las células se marcaron con Fluo-LOJO (Teflabs) 4 μ M en DMEM que contenía un 10 % de FCS durante 90 minutos a 37°C. Las células se hicieron girar en FCS y se usaron inmediatamente.

Ensayo en placa de virus y VSV

Los serotipos de VSV Indiana (VSV-IND, clon derivado de Mudd-Summers, rescatados *in vitro* (Whelan et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92:8388) y purificados en placas) o New Jersey (VSV-NJ, Pringle Isolate, purificados en placas) se propagaron a una MOI de 0,01 en células BSRT7. Los sobrenadantes de células infectadas selimpiaron de residuos celulares mediante centrifugación a 2000 x g, se filtraron a través de filtros estériles de 0,45 μ m y se sometieron a ultracentrifugación a 40.000 x g durante 90 minutos. Los aglomerados se resuspendieron en PBS y se purificaron mediante ultrafiltración (157.000 x g, 60 minutos) mediante una almohadilla de sacarosa al 10 % en NTE

(NaCl, 0,5 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 5 mM, pH 8). Tras la resuspensión en PBS durante la noche, la proteína vírica se cuantificó en un ensayo BCA (Pierce), y la infectividad se cuantificó mediante ensayo en placa. Algunos lotes se marcaron con ésteres de succinimidilo de ácido carboxílico, o con AlexaFluor-488 o AlexaFluor-568 (Invitrogen-Molecular Probes) a un exceso molar de 10⁴-10⁵ veces de colorante Alexa respecto a las partículas de virus. El colorante no conjugado se eliminó mediante centrifugación a través de sacarosa al 10 % en NTE, los aglomerados se resuspendieron en PBS, y se almacenaron congelados. La infectividad de las preparaciones de VSV de cuantificaron mediante ensayos en placa con en células de riñón de mono verde (Vero). Los títulos de VSV procedentes de los órganos de los ratones infectados se determinaron de forma similar, tras homogeneización de los órganos con un homogeneizador Potter-Elvehjem. Cuando sea necesario, durante la preparación del virus, los aproximadamente 4 ml de sobrenadantes de la ultracentrifugación de 157.000 x g se recogieron y se concentraron con un 10,000 MWCO Amicon Ultra (Millipore). Para tener en cuenta la infectividad residual en sobrenadantes concentrados, las soluciones madre de VSV se diluyeron hasta niveles de infectividad iguales a los de los sobrenadantes concentrados, y el flujo de calcio en linfocitos B VI10YEN y se comparó con diluciones de más de 100 veces de VSV y sobrenadante. Adenovirus 5 (AdV5) marcados con AlexaFluor-568 e inactivados con UV se generaron mediante procedimientos estándar (Leopold et al., 1998, Human Gene Therapy, 9:367). Todo el trabajo infectivo se llevó a cabo en espacios de trabajo configurados en BL2+, según las directrices institucionales, y aprobados por el Harvard Committee on Microbiological Safety.

Ensayo de neutralización del VSV

El suero de ratones inmunizados se prediluyó 40 veces en MEM que contiene FCS al 2 %. Diluciones en serie de dos veces se mezclaron con volúmenes iguales de VSV 500 ufp/ml) y se incubaron durante 90 minutos a 37°C en CO₂ al 5 %. 100 µl de mezcla suero-virus se transfirieron a monocapas de células Vero en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Las monocapas se superpusieron con 100 µl de DMEM que contenía metilcelulosa al 1 % y se incubaron durante 24 horas a 37°C. A continuación, la superposición se descartó, y la monocapa se fijó y se tiñó con violeta cristal al 0,5 %. La mayor dilución de suero que redujo el número de placas en un 50 % se capturó como título. Para determinar los títulos de IgG, el suero sin diluir se pretrató con un volumen igual de β-mercaptoetanol en solución salina 0,1 mM.

Ensayos de adhesión

Placas de 96 pocillos (Corning) se revistieron durante la noche con diluciones de VCAM-1-Fc o ICAM-1-Fc (R&D systems) murino recombinante, o VSV-IND purificado en PBS por triplicado. Los controles negativos se revistieron con BSA al 4 %, los pocillos positivos para el control se revistieron con poli-L-lisina 1 mg/ml. Las placas se bloquearon durante 1-2 h a 4°C con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS)/BSA al 1 % y se lavaron. Linfocitos B no expuestos procedentes de ratones VI10YEN o C57BL/6 se seleccionaron negativamente mediante separación celular magnética usando perlas magnéticas CD43 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) y se añadieron a las placas a 3 x 10⁵/pocillo en HBSS con BSA al 1 %, Ca₂⁺ 1 mM u Mg₂⁺ 1 mM en presencia o ausencia de VSV-IND inactivado mediante UV (MOI de 1000) durante 30 minutos a 37°C. Tras el lavado del agente (3 veces en HB - HBSS con BSA al 1 %), las placas se fijaron durante 10 minutos con PBS/10 % glutaraldehído, se tiñeron durante 45 minutos con violeta de cristal 0,5 %/metanol 20 %, y se lavaron con agua. El colorante se eluyó por adición de SDS al 1 % y se determinó espectrofotométricamente la absorbancia a 570 nm (lector de microplacas SpectraMax340PC y programa informático SoftmaxPro 3.1.2, Molecular Devices Corporation) después de 30 minutos.

Microscopía confocal

Para algunos análisis, los ratones C57BL/6 recibieron una inyección en ambas almohadillas plantares traseras con 20 µg de VSV-IND o VSV-NJ marcados con AlexaFluor-568 o AlexaFluor-488 durante 30 minutos. Para otros experimentos, los ratones recibieron una transfusión con 1 x 10⁷ linfocitos B no expuestos seleccionados negativamente procedentes de ratones VI10YEN x MHCII-EGFP un día antes del experimento. En puntos temporales predeterminados, los LN popliteales se fijaron in situ mediante inyecciones en la almohadilla plantar de L-lisina tamponada con fosfato con paraformaldehído al 1 % en peryodato (PLP). Tras retirar los LN popliteales y 3-5 horas de incubación in PLP a 4°C, los LN popliteales se lavaron en PBD 0,1 M, pH 7,2 y se crioprotegieron mediante una serie creciente de sacarosa al 10 %, 20 %, y 30 % en PBS. Las muestras se congelaron inmediatamente en líquido congelador de TBS (Triangle Biomedical Sciences, Durham NC) y se almacenaron a -80°C. Secciones de 40 µm de grosor se montaron en portas Superfrost Plus (Fisherbrand) y se tiñeron con anticuerpos fluorescentes en una cámara humidificada tras bloqueo del receptor Fc con 1 µg/ml de anticuerpo 2.4G2 (BD Pharmingen). Las muestras se montaron en solución de reactivo FluorSave (EMD-Calbiochem) y se almacenaron a 4°C hasta su análisis. Se recogieron imágenes con un sistema de microscopía confocal BioRad usando un microscopio Olympus BX50WI y objetivos 10x/0,4 o 60x/1,2W. Las imágenes se analizaron con el programa informático LaserSharp2000 (BioRad Cell Science, Hemel Hempstead, Gran Bretaña) y Photoshop CS (Adobe). La cuantificación de linfocitos B en la frontera T/B se realizó contando células que estuvieran en unos 50µm desde la frontera T/B, como se denota mediante contraindicación con B220, cualquier célula situada en regiones más centrales se consideró folicular.

Microscopio electrónico

Los LN popliteales se fijaron in situ mediante inyección en la almohadilla plantar de formaldehído al 2 % y glutaraldehído al 2,5 % en tampón de cacodilato de sodio 0,1 M, pH 7,4. Los LN se extirparon y se sumergieron en el mismo tampón durante la noche a 4°C, se lavaron en tampón cacodilato y se osmicaron con tetraóxido de osmio al 1 %/ ferrocianuro de potasio al 1,5 % (en agua) durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Tras lavado con agua, las muestras se lavaron 3-4 veces en tampón maleato 0,05 M pH 5,15. Las muestras se contratiñeron durante 2 horas en acetato de uranilo al 1 % en tampón maleato y se lavaron tres veces en agua. Las muestras se deshidrataron por incubación durante 15 minutos en diluciones de etanol en agua (70 %-90 %-100 %), se incubaron en óxido de propileno durante 1 hora, y se transfirieron a Epon mezclado 1:1 con óxido de propileno TA durante la noche. Las muestras se movieron a un molde de impregnación relleno con Epon recientemente mezclado, y se calentaron durante 24-48 horas a 60°C para polimerización. Las muestras se analizaron en un microscopio electrónico Tecnai G2 Spirit BioTWIN en las instalaciones de la Harvard Medical School EM.

15 *Microscopía multifotón intravital (MP-IVM) de los LN popliteales*

Linfocitos B no expuestos se seleccionaron negativamente mediante separación magnética usando perlas CD43 (Miltenyi). Los linfocitos B V110YEN se marcaron durante 20 minutos a 37°C con 5-(y 6)-((4-clorometil)benzoil) amino)tetrametil rodamina 10 µM (CMTMR; Invitrogen), Los linfocitos B C57BL/6 B se marcaron durante 25 minutos a 37°C con 7-amino-4-clorometilcumarina 10 µM (CMAC; Invitrogen). En algunos experimentos, las marcas se intercambiaron entre linfocitos B naturales y V110YEN para excluir efectos no específicos del colorante. Los linfocitos B 5-6 x 10⁶ de cada población se mezclaron y se transfirieron de forma adoptiva mediante inyección en la vena de la cola de ratones receptores C57BL/6 un día antes del análisis. En algunos experimentos, los ratones receptores C57BL/6 habían recibido una inyección de 30 µl de CLL en la almohadilla plantar posterior 7-10 días antes del experimento para eliminar los macrófagos SCS (Deleamarre et al., 1990, J. Leukoc. Biol., 47:251). Dieciocho horas después de la transferencia adoptiva de linfocitos B, los ratones receptores se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de ketamina (50 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). El LN popliteal derecho se preparó microquirúrgicamente para MP-IVM y se colocó en una plataforma de microscopio hecha a medida como se describe (Mempel et al., 2004, Nature, 427:154). Se tuvo cuidado al separar los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos aferentes. El LN expuesto se sumergió en solución salina normal y se cubrió con un cubreobjetos de vidrio. Se colocó un tempar cerca del LN para controlar la temperatura local, que se mantuvo a 36-38°C. Se realizó el MP-IVM en un sistema BioRad 2100MP a una longitud de onda de excitación de 800 nm, procedente de un láser MaiTai Ti:zafiro ajustable (Spectra-Physics). VSV marcado de forma fluorescente (20 µg in 20 µl) se inyectó a través de una aguja 31G en la almohadilla plantar posterior derecha del ratón receptor concomitante con la observación. Para análisis tetradimensional fuera de línea de la migración celular, se adquirieron pilas de 11 secciones x-y ópticas con una separación z de 4 µm cada 15 segundos con ampliación electrónica hasta 1,8x-3x mediante un objetivo de inmersión en agua 20x/0,95 (Olympus). La fluorescencia emitida y las señales del segundo armónico se detectaron con filtros de baso de banda de 400/40 nm, 450/80 nm, 525/50 nm, y 630/120 nm sin detectores de barrido para generar imágenes en tres colores. Las secuencias de pilas de imágenes se transfirieron en películas tetradimensionales de cámara rápida usando el programa informático Volocity (Improvision). Las velocidades 3D instantáneas se determinaron mediante un rastreo celular semiautomático con Volocity y análisis informático con Matlab (Mathworks). La acumulación de células en la SCS se determinó mediante análisis manual de la película realizado mediante observadores enmascarados. Cada 2 minutos, los linfocitos B V110YEN y los linfocitos B policlonales se contaron en la SCS, en el folículo superficial (<50 µm distancia desde la SCS) y el folículo profundo (>50 µm distancia desde la SCS), y los cociente se linfocitos B V110YEN/policlonales se expresó para cada compartimento para la totalidad de los 30 minutos de película.

Canulación del conducto torácico

Para la canulación del conducto torácico, los ratones recibieron 200 µl de aceite de oliva p.o. 30 minutos antes de la canulación para facilitar la visualización de los vasos linfáticos. A continuación, los animales se anestesiaron mediante xilazina (10 mg/kg) y ketamina HCl (50 mg/kg). Se introdujo un catéter de polietileno (PE-10) en la vena yugular derecha para la infusión continua (2 ml/hora) de lactato de Ringer (Abbott Laboratories, North Chicago, IL) que contenía heparina 1 U/ml (American Pharmaceutical partners, Los Angeles, CA). Usando un microscopio de disección, el TD se expuso mediante incisión subcostal izquierda. Una conducción de silicona Silastic® (0,012" D.I., Dow Corning, Midland, EE.UU.) se lavó con solución salina tamponada con fosfato heparinizada (50 U/ml) (DPBS, Mediatech, Herndon, VA), se introdujo que la cisterna del quilo a través de una incisión de aproximadamente 0,3 mm y se fijó con monómero de cianoacrilato de isobutilo (Nexaband®, Abbott Laboratories). La parte restante de la conducción se exteriorizó a través de la pared abdominal posterior. Posteriormente, la incisión abdominal se cerró con una sutura corrida 6-0 no absorbible (Sofsilik, Tyco Healthcare Group, Norwalk, CO). Después de un equilibrado durante 30 minutos del flujo linfático, los animales recibieron una inyección en la almohadilla plantar de 10⁸ ufp de VSV-IND y las muestras de linfa se recogieron sobre hielo durante 6 horas. La linfa y los órganos se extrajeron después de 6 horas de recogida de linfa desde el conducto torácico y se sembró en placas como se ha descrito anteriormente. La linfa y los órganos se sembraron en placas como se ha descrito anteriormente. En algunos experimentos, los ganglios popliteales y para aórticos drenantes se extirparon quirúrgicamente y los vasos linfáticos circundantes se cauterizaron para evitar el acceso de los virus desde la linfa transmisora hasta la sangre.

Resultados y discusión

Los ganglios linfáticos (LN) evitan la diseminación sistémica de patógenos, tales como los virus que entran en las superficies del cuerpo, desde los sitios de infección periféricos. Son también la etapa de espera de las respuestas inmunitarias adaptativas a los antígenos derivados de patógenos (von Andrian y Mempel, 2003, *Nat. Rev. Immunol.*, 3:867; y Karrer et al., 1997, *J. Exp. Med.*, 185:2157). No está clara la forma en que las partículas víricas se aclaran de la linfa aferente y se representan a los linfocitos B análogos para inducir las respuestas de anticuerpo. En el presente documento, los inventores identificaron una población de macrófagos CD11b+CD169+MHCII+ sobre el lecho del lecho subcapsular (SCS) y en la médula de los LN que capturan las partículas víricas unos pocos minutos después de la inyección subcutánea (s.c.). Los macrófagos SCS translocan las partículas víricas unidas a la superficie a través del lecho SCS y las presentan a linfocitos B migrantes en los folículos subyacentes. El agotamiento selectivo de estos macrófagos comprometen la retención vírica local, agravan la viremia del hospedador, y desequilibran la activación de linfocitos B locales. Estos hallazgos indican que los macrófagos CD169+ tienen una doble función fisiológica. Actúan como "papel de mosca" innato evitando la diseminación sistémica de los patógenos transmitidos por la linfa, y como guardianes fundamentales en la interfase entre el tejido y la linfa, lo que facilita el reconocimiento de los antígenos en forma de partículas por los linfocitos B, y el inicio de las respuestas inmunitarias humerales.

Los inventores han investigado la forma en que las partículas víricas que entran en los tejidos periféricos se tratan en el interior de los LN drenantes. Las almohadillas plantares traseras de ratones se inyectaron con el virus de la estomatitis vesicular (VSV) inactivado mediante UV y marcado de forma fluorescente, que es un rhabdovirus citopático transmitidos mediante picaduras de insectos (Mead et al., 2000, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 916:437) y desencadena respuestas de linfocitos B neutralizantes independientes de T (Bachmann et al., 1995, *Eur. J. Immunol.*, 25:3445). Usando microscopía multifotón intravital (MP-IVM) en LP popliteales (Mempel et al., 2004, *Nature*, 427:154) drenantes de la almohadilla plantar inyectada, los investigadores observaron que los VSV se acumulaban en parches discretos sobre el lecho SCS pocos minutos después de la inyección subcutánea, mientras que el parénquima y el techo de los SCS permanecían exentos de virus (Figura 11A). Los depósitos víricos se volvieron cada vez más densos, formando patrones reticulares irregulares, que permanecieron fijos en su lugar durante horas.

Para caracterizar los sitios de predilección para la unión de VSV en los LN, los investigadores reconstituyeron ratones Act(EGFP) irradiados con médula ósea no tratada. Las quimeras B6→Act(EGFP) resultantes expresaban EGFP en células no hematopoyéticas, supuestamente células endoteliales linfáticas, sobre el lecho y el techo. Tras la inyección en la almohadilla plantar de VSV fluorescente en las quimeras C57BL/6→Act(EGFP), las partículas víricas inundaron el SCS. Tres horas después, el VSV luminal no unido había desaparecido, pero el lecho SCS mostró parches relevantes de VSV que no se había localizado simultáneamente en células EGFP+, lo que sugiere que el VSV queda capturado en las células hematopoyéticas (Figura 11B). Para caracterizar los posibles leucocitos capturadores de VSV, los inventores aplicaron el microscopio electrónico a los LN popliteales que se habían recogido 5 min después de la inyección de VSV (Figura 11C). Las partículas de VSV de forma esférica densas en electrones se unieron selectivamente a regiones discretas de la superficie de las células grandes dispersas localizadas en el SCS o justo bajo el lecho SCS. Las células que se unen a VSV que se localizaron bajo el lecho de SCS estaba normalmente en contacto con el compartimiento de la linfa a través de salientes que se extienden al interior de la luz de SCS.

Los estudios de ultraestructura de los LN han confirmado que SCS contiene muchos macrófagos (Clark, 1962, *Am. J. Anat.*, 110:217; y Farr et al., 1980, *Am. J. Anat.*, 157:265), de forma que los autores teorizan que las células que retienen el VSV pertenecen a esta población. De hecho, la microscopía confocal de las secciones de LN congeladas obtenidas treinta minutos después de la inyección en la almohadilla plantar mostraron que el VSV se situaba en el SCS junto con un marcador de macrófagos, CD169/la sialoadhesina (Figura 11D). Usando citometría de flujo, los autores detectaron CD169 en aproximadamente 1 %-2 % de las células mononucleares (MNC) de los LN, que expresaban simultáneamente de manera uniforme CD11b y MHC-II, lo que indica que las células de unión a VSV son indudablemente macrófagos (Figura 12). La mayoría de células CD169+ también expresan otros marcadores de macrófagos, incluyendo CD68 y F4/80, aunque pocas expresan el marcador de granulocitos/monocitos Gr-1. Las células CD169+ también expresan CD11c, pero a niveles menores que las células dendríticas convencionales CD11c^{alta}(DC). Los inventores concluyen que los viriones intactos entran en la linfa minutos después de una deposición transcutánea y se acumulan de forma rápida y selectiva sobre macrófagos de la médula y el SCS de LN drenantes.

Para explorar los mecanismos de fijación del virus, se inyectó VSV vivo (20 µg que contenían 2 x 10⁸ ufp) en las almohadillas plantares posteriores, y los títulos víricos en los LN drenantes se evaporaron 2 horas después. No se produjeron defectos en la retención de VSV en los LN drenantes de ratones deficientes en el complemento C3 (Figura 11E). Los ratones DH-LMP2a, que carecen de inmunoglobulinas secretadas, han reducido los títulos víricos en el bazo, pero no en los LN popliteales (Figura 11F). Por lo tanto, la fijación de VSV a los LN se produce mediante un mecanismo diferente al usado en los macrófagos de la zona marginal esplénica, lo que requiere que los anticuerpos tanto C3 como naturales capturan el VSV transmitido por la sangre (Ochsenbein et al., 1999, *J. Exp. Med.*, 190:1165; y Ochsenbein et al., 1999, *Science*, 286:2156). Aparentemente, la glicoproteína superficial de VSV

(VSV-G) se puede reconocer en los LN mediante receptores secuestrantes de unión a hidratos de carbono expresados en macrófagos (Taylor et al., 2005, Ann. Rev. Immunol., 23:901), pero el mecanismo preciso requerirá investigación adicional.

5 ¿Cuáles son las consecuencias de la captura vírica mediante macrófagos sobre la diseminación del virus y la inmunidad antivírica? Para abordar esta cuestión, los investigadores agotaron los macrófagos residentes en los LN mediante inyección en la almohadilla plantar de liposomas de clodronato (CLL; Delemarre et al., 1990, J. Leukoc. Biol., 47:251). A la dosis utilizada, el CLL inyectado se eliminó selectivamente los macrófagos de los LN drenantes del sitio de inyección, incluyendo los LN popliteales, inguinales y paraaórticos (Delemarre et al., 1990, J. Leukoc. Biol., 47:251), aunque los macrófagos en los LN distales y del bazo fueron conservados (Figuras 13A, B). Entre los diferentes fagocitos CD11b⁺MHCII⁺ residentes en los LN, CLL eliminó preferentemente el subconjunto CD169⁺, mientras que las células LYVE-1⁺ y las DC convencionales quedaron inalteradas. Los LN popliteales tratados con CLL experimentaron un aumento en la cantidad de linfocitos B, y un agrandamiento de los folículos 7 días después del tratamiento, pero otros parámetros morfológicos, por ejemplo, la demarcación de la frontera T/B y la estructura SCS quedaron inalteradas (Figuras 13C-E).

En comparación con los LN sin tratar, los investigadores recuperaron aproximadamente 10 veces menos títulos víricos de los LN drenantes de los ratones tratados con CLL (Figura 11G), lo que sugiere que el agotamiento de macrófagos hace que la filtración de la linfa sea ineficaz. De hecho, Los títulos de VSV aumentaron de forma importante en la sangre, bazo, y en los LN drenantes de ratones tratados con CLL. La diseminación vírica desde el sitio de inyección hasta la sangre depende estrictamente del drenaje linfático, porque los VSV en circulación fueron indetectables cuando el virus se inyectó en las almohadillas plantares de ratones que llevaban un catéter de oclusión en el conducto torácico (TD), incluso en ratones tratados con CLL. Los títulos víricos fueron bajos, pero detectables, en el fluido linfático TD de los ratones no tratados, pero significativamente mayores en los animales tratados con CLL (Figura 11H). esto indica que el conducto principal de la diseminación vírica temprana desde los tejidos periféricos es la linfa, que se controla mediante los macrófagos sensibles a CLL residentes en los LN que evitan la diseminación sistémica del VSV transmitido por la linfa.

Este mecanismo de captura no era exclusivo del VSV; los macrófagos CD169⁺ de SCS también retuvieron adenovirus (AdV; Figuras 14A-C) y virus vaccinia (VV, Figura 14D), indicando que los macrófagos actúan como guardianes contra muchos patógenos estructuralmente diferentes. Por el contrario, perlas de látex del tamaño del virus (200 nm) se retuvieron mal en el SCS tras la inyección en la almohadilla plantar (Figura 14E). De este modo, los macrófagos del SCS discriminan entre virus transmitidos por la linfa y otras partículas de tamaño similar. VSV, AdV y VV también se acumularon en la médula de LN drenantes, donde no solamente se unen a células CD169^{bajo} (Figura 11D) sino también a las células endoteliales linfáticas CD169⁺LYVE-1⁺ (Figuras 14C, D). Esto se corroboró en LN tratados con CLL, donde VSV se acumula exclusivamente sobre células LYVE-1⁺ medulares (Figura 15).

A continuación, los autores examinaron la forma en que los linfocitos B reconocen los VSV capturados. Los LN popliteales contienen linfocitos B raros en la luz del SCS (Figura 16A), pero los inventores no encontraron evidencias de linfocitos de unión a virus dentro del SCS en las electromicrografías. En su lugar, las partículas víricas se presentaron a los linfocitos B de los folículos superficiales mediante macrófagos que se extienden a través del lecho del SCS. Tras la inyección de VSV (Figura 17A) o AdV (Figuras 16B-E), los viriones se detectaron rápidamente en las interfases de linfocito B-macrófagos durante al menos 4 horas. Esto sugiere que los macrófagos del SCS transportan las partículas víricas a través del lecho del SCS para su presentación a los linfocitos B. La transcitosis parecía improbable, porque las pocas vesículas que contienen VSV en los macrófagos del SCS mostraron evidencia de degradación vírica. Además, los inventores no detectaron una motilidad sustancial de los macrófagos de unión a virus mediante MP-IVM, al menos durante las primeras 6 horas después del estímulo. Por lo tanto, muy probablemente, las partículas víricas alcanzaron el parénquima de los LN moviéndose a lo largo de la superficie del macrófago. Cabe destacar que, VSV y el resto de antígenos también se presentaron a los linfocitos B mediante migración DC desde ubicaciones periféricas (Ludewig et al., 2000, Eur. J. Immunol., 30:185; y Qi et al., 2006, Science, 312:1672), pero las DC derivadas de la almohadilla plantar no parecen tener un papel durante estos eventos muy tempranos, porque su migración a los LN popliteales tarda mucho más. Los inventores concluyen que el lecho del SCS no es insuperable para los virus transmitidos por la linfa; los macrófagos CD169⁺ parecen actuar como porteros y facilitadores de la translocación vírica y la presentación a linfocitos B.

A continuación, los autores aprovecharon la forma en que los linfocitos B no expuestos responden al encuentro vírico usando los serotipos de VSV, Indiana (VSV-IND) y New Jersey (VSV-NJ) (Figura 18; Roost et al., 1996, J. Immunol. Methods, 189:233). Los inventores compararon los linfocitos B, con los linfocitos B de los ratones V110YEN, que expresan un receptor de linfocitos B específico de VSV-IND que no se une a VSV-NJ (Hangartner et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 100:12883). Por el contrario, una pequeña fracción (2 %-5 %) de los linfocitos B naturales se unen a ambos serotipos sin quedar activados. Esto reflejaría una reactividad de baja afinidad con VSV-G o interacciones indirectas, por ejemplo, mediante el complemento (Rossbacher y Shlomchik, 2003, J. Exp. Med., 198:591). Para evaluar las respuestas *in vivo*, linfocitos B naturales y V110YEN marcados de forma diferentes se transfirieron de forma adoptiva y se dejaron alojarse en los folículos del LN. A continuación, virus inactivado fluorescente para UV se inyectaron en las almohadillas plantares y los LN popliteales se registraron mediante MP-IVM aproximadamente 5-35 minutos después. En LN exentos de virus, o tras la inyección de VSV-NJ, los linfocitos B

VI10YEN y de control mostraron la misma distribución (Figuras 17B-C). Por el contrario, tras la inyección de VSV-IND, las células VI10YEN se acumularon rápidamente bajo y en el lecho de SCS. No hubo diferencias en la motilidad inicial de los linfocitos B y la distribución entre LN tratados con CLL y sin tratar, lo que sugiere que los linfocitos B específicos de VSV son igualmente adecuados para demostrar el SCS en ambas condiciones. Sin embargo, en los LN tratados con CLL, el virus fluorescente no quedó retenido en el SCS y las células VI10YEN B no pudieron congregarse en dicha región, lo que indica que los macrófagos del SCS son esenciales para ambos eventos (Figura 17B).

Para cuantificar rigurosamente la distribución de linfocitos B VI10YEN, Los LN se recogieron 30 minutos después del estímulo con VSV y se analizaron con microscopía confocal. Aunque la totalidad de la población VI10YEN folicular retenida en esta distribución global (Figura 17D), el subconjunto de células que reside $\leq 50 \mu\text{m}$ por debajo del SCS se desplazó al SCS en VSV-IND, pero no los LN que contienen VSV-NJ (Figura 17E). Parece improbable que las células VI10YEN se redistribuyan al SCS debido a las señales quimioatrayentes, puesto que los linfocitos B policlonales no sensibles expresan los mismos receptores quimioatrayentes. Con mayor probabilidad, los contactos aleatorios entre las células VI10YEN móviles y el VSV-IND unido a macrófagos desencadena una "señal de detención" dependiente de BCR (Okada et al., 2005, PLoS Biol., 3:e150): La exposición a corto plazo a VSV-IND activa las integrinas LFA-1 y/o $\alpha 4$ (Dang y Rock, 1991, J. Immunol., 146:3273) en linfocitos B VI10YEN, dando como resultado la adhesión a sus respectivos ligandos, ICAM-1 y VCAM-1, ambos expresados en el SCS (Figura 19). Además, el VSV-IND unido a los macrófagos del SCS pueden proporcionar un sustrato para la adhesión de los linfocitos B VI10YEN directamente mediante el BCR.

Para investigar la forma en que los viriones capturados se procesan tras su detección mediante linfocitos B, los investigadores analizaron linfocitos B procedentes de ratones VI10YENxMHCII-EGFP, que nos permitió visualizar el VSC atrapado por endocitosis situado simultáneamente con el MHC-endosómico como indicador del cebado celular (Vascotto et al., 2007, Curr., Opin., Immunol., 19:93). En un plazo de 30 minutos después de la inyección, los linfocitos B VI10YENxMHCII-EGFP del folículo superficial habían internalizado ampliamente el VSV-IND, pero no las partículas VSV-NJ (Figuras 20A, B). Los linfocitos B específicos de VSV que transportan virus son infrecuentes, pero detectables en los folículos profundos. Estas células pueden haber adquirido viriones de los linfocitos B policlonales raros que transportan el VSV en su superficie, o se pueden corresponder con células VI10YEN que no han conseguido detenerse en el SCS tras adquirir el VSV-IND.

Aunque los hallazgos histológicos de los inventores demuestran que los viriones intactos se detectan preferentemente en los linfocitos B del SCS y del folículo superficial, las mediciones MP-IVM de la motilidad de los linfocitos B reveló una diseminación del antígeno más amplia. Tras la inyección de VSV-IND, las células VI10YEN mostraron una disminución rápida de la velocidad a través del folículo B completo, (Figura 21). Esto se observó análogamente en los LN tratados y de control, lo que indica que antígeno vírico alcanza los linfocitos B independientemente de los macrófagos. Con mucha probabilidad, este material antigénico estaba compuesto de proteína vírica libre, un subproducto inevitable de las infecciones naturales. De hecho, el sobrenadante purificado de las soluciones madre de VSV de los inventores indujeron un potente flujo de calcio en linfocitos B VI10YEN (Figura 18E). Se sabe que las pequeñas proteínas transmitidas por la linfa se difunden rápidamente al interior de los folículos y activan los linfocitos B análogos (Pape et al., 2007, Immunity, 26:491). En consecuencia, la inyección se sobrenadante vírico suprimió la motilidad de los linfocitos B VI10YEN foliculares sin inducir su acumulación en el SCS, lo que indica que el VSV-G libre estaba contenido y activo dentro del inóculo vírico. Esto puede explicar el efecto panfolicular independiente de macrófagos de la inyección de VSV-IND.

Para determinar la cinética de la activación de linfocitos B VI10YEN tras el encuentro con el virus, los inventores midieron los marcadores de activación comunes (Figura 22). La molécula coestimuladora CD86 se reguló en exceso en primer lugar 6 horas después del estímulo con VSV-IND. CD69 se indujo más rápidamente, pero también en los linfocitos B policlonales, supuestamente mediante señalización de IFN- α pleiotrópica (Barchet et al., 2002, J. Exp. Med., 195:507; y Shiow et al., 2006, Nature, 440:540). La IgM superficial (Figuras 20C, D) se reguló por defecto ya a los 30 minutos después del estímulo, alcanzando un máximo en un plazo de 2 h cuando $>70 \%$ de células VI10YEN eran BCR^{bajo/neg}. Por lo tanto, la internalización de BCR proporcionó la lectura específica más temprana de la activación de linfocitos B específicos del virus. De forma notable, los linfocitos B VI10YEN de LN tratados con CLL no consiguieron regular por defecto sus BCR durante las 2 primeras horas tras la inyección subcutánea de 20 μg de VSV-IND (Figura 20E), lo que indica que los macrófagos del SCS son necesarios para una presentación eficaz de los viriones capturados a los linfocitos B.

Los linfocitos B cebados pueden eventualmente solicitar ayuda a los linfocitos T CD4+ T (Vascotto et al., 2007, Curr., Opin., Immunol., 19:93) para una recombinación de cambio de clase y formación del centro germinal. Para entrar en contacto con los linfocitos T, los linfocitos B recientemente activados migran hasta la frontera T/B (Okada et al., 2005, PLoS Biol., 3:e150; y Reif et al., Nature, 416:94). Este mecanismo funcionó eficazmente en ratones con macrófagos suficientes; la mayoría de linfocitos B VI10YEN se redistribuyen a la frontera T/B en un plazo de 6 h después de la inyección en la almohadilla plantar de tan solo 40 ng de VSV-IND (Figuras 20F, H y23). Por el contrario, fue necesaria una dosis vírica 100 veces mayor para desencadenar una redistribución completa de los linfocitos B VI10YEN en los ratones tratados con CLL (Figuras 20G, H). Aproximadamente 12 horas después de la inyección, la mayoría de linfocitos específicos de VSV alcanzaron la frontera T-B, independientemente de la dosis

inyectada. De este modo, incluso sin macrófagos del SCS, los linfocitos B foliculares quedan en su caso activados por antígenos derivados de VSV, aunque de forma menos eficaz.

5 En conclusión, Los autores demostraron un papel doble de los macrófagos CD169+ en los LN: capturan virus transmitidos por la linfa impidiendo su diseminación sistémica y guían los viriones capturados a través del lecho del SCS para su presentación eficaz y activación de los linfocitos B foliculares.

Ejemplo 2: Arquitecturas de nanotecnología de vacunas basadas en lípidos

10 Nanotransportadores de liposomas.

Este es un ejemplo comparativo. Liposomas pequeños (10 nm - -1000 nm) se fabricaron y emplearon para administrar uno o múltiples agentes inmunomoduladores a células del sistema inmunitario (Figura 3). En general, los liposomas son vesículas lipídicas esféricas construidas artificialmente, cuyo diámetro controlable de decenas a miles de nm significa que los liposomas individuales comprenden compartimentos biocompatibles con un volumen de zeptolitros (10^{-21} l) a femtolitros (10^{-15} l) que se pueden usar para encapsular y almacenar cargas diversas tales como proteínas, enzimas, ADN y moléculas de fármaco. Los liposomas pueden comprender una bicapa lipídica que tiene una propiedad anfífilica: ambas superficies interior y exterior de la bicapa son hidrófilas; y la luz de la bicapa es hidrófoba. Las moléculas lipófilas pueden replegarse de forma espontánea formando membranas de liposoma y retienen sus dominios hidrófilos en el exterior, y las moléculas hidrófilas se pueden conjugar químicamente a la superficie exterior del liposoma, aprovechando la biofuncionalidad de la membrana.

Los lípidos se mezclan con un agente inmunomodulador lipófilo, y a continuación se forman en películas finas sobre una superficie sólida. Un agente inmunomodulador se disuelve en una solución acuosa, que se añade a las películas lipídicas para hidrolizar los lípidos con vortización. Los liposomas con los agentes inmunomoduladores lipófilos incorporados en la pared de la bicapa, y los agentes inmunomoduladores situados en la luz del liposoma se ensamblan de forma espontánea.

30 Nanotransportadores de liposomas estabilizados con nanopartículas

Este es un ejemplo comparativo. Los liposomas estabilizados con nanopartículas son útiles para administrar uno o una pluralidad de agentes inmunomoduladores a las células del sistema inmunitario (Figura 4). Cuando las partículas de carga pequeña se acercan a la superficie de los liposomas que tienen bien carga opuesta o no tienen carga neta, la interacción electrostática o carga-dipolo entre las nanopartículas y la membrana atrae las nanopartículas para que permanezcan sobre la superficie de la membrana, quedando parcialmente envueltas por membrana lipídica. Esto induce una flexión local en la membrana y una tensión superficial globular de los liposomas, estos dos permiten ajustar la rigidez de la membrana. Este aspecto es importante para la administración de vacunas usando liposomas para imitar virus cuya rigidez depende de la composición de otros componentes biológicos incluidos dentro de la membrana del virus. Además, las nanopartículas adsorbidas forman una envoltura cargada que protege a los liposomas contra la fusión, potenciando de esta forma la estabilidad del liposoma. Las nanopartículas pequeñas se mezclan con los liposomas tras una vortización suave, y las nanopartículas se adhieren a la superficie del liposoma de forma espontánea.

45 Nanotransportador de liposoma-polímero

Este es un ejemplo comparativo. Los nanotransportadores de liposoma-polímero se utilizan para administrar uno o una pluralidad de agentes inmunomoduladores a las células del sistema inmunitario (Figura 5). En lugar de mantener el interior del liposoma hueco, los agentes inmunomoduladores pueden estar encapsulados. La Figura 3 muestra liposomas que están cargadas con nanopartículas de copolímeros dibloque para formar nanotransportadores poliméricos revestidos con liposomas, que tienen las ventajas tanto de los liposomas como de las nanopartículas poliméricas, aunque excluyendo algunas de sus limitaciones. La envoltura de liposomas se puede utilizar para transportar agentes inmunomoduladores lipófilos o hidrófilos conjugados, y el núcleo polimérico se puede usar para administrar agentes inmunomoduladores hidrófobos. Las nanopartículas poliméricas preformuladas (40 nm - -1000 nm) se mezclan con liposomas pequeños (20 nm - 100 nm) con vortización suave para inducir la fusión de los liposomas sobre la superficie de la nanopartícula polimérica.

Nanotransportadores de polímero-liposoma estabilizados con nanopartículas

60 Este es un ejemplo comparativo. Los nanotransportadores de polímero-liposoma estabilizados con nanopartículas se utilizan para administrar uno o una pluralidad de agentes inmunomoduladores (Figura 6). Mediante la adsorción de nanopartículas pequeñas (1 nm - 30 nm) en la superficie del nanotransportador de liposoma-polímero, el nanotransportador no solo tiene la ventaja de los liposomas estabilizados mediante nanopartículas anteriormente mencionados (Figura 4) y de las nanopartículas de liposoma-polímero anteriormente mencionadas (Figura 5), sino también una rigidez ajustable de la membrana y una estabilidad controlable del liposoma.

65 Nanoportadores de liposoma-polímero que comprenden micelas inversas

Este es un ejemplo comparativo. Los nanotransportadores de liposoma-polímero que contienen micelas inversas se utilizan para administrar uno o una pluralidad de agentes inmunomoduladores (Figura 7). Puesto que los nanotransportadores de liposoma-polímero anteriormente mencionados (Figuras 5 y 6) están limitados a transportar agentes inmunomoduladores hidrófobos dentro de nanopartículas poliméricas, aquí, se formulan micelas pequeñas (1 nm - 20 nm) inversas par encapsular agentes inmunomoduladores hidrófilos, y posteriormente mezclarlos con copolímeros dibloque para formular los núcleos poliméricos de liposomas.

Un agente inmunomodulador hidrófilo que se va a encapsular se incorpora en primer lugar en micelas inversas mezclando con entidades anfifílicas naturalmente derivadas y entidades anfifílicas no tóxicas en un compuesto volátil, un disolvente orgánico miscible en agua. La mezcla resultante de polímero biodegradable y micela inversa se combina con un no disolvente hidrófilo insoluble en polímero para formar nanopartículas mediante la difusión rápida del disolvente en el no disolvente y evaporación del disolvente orgánico. Las micelas inversas incluidas en nanopartículas poliméricas se mezclan con moléculas lipídicas para formar la estructura compleja de liposoma-polímero anteriormente mencionada (Figura 5).

Nanoportadores de liposoma-polímero estabilizados con nanopartículas que comprenden micelas inversas

Este es un ejemplo comparativo. Los nanotransportadores de liposoma-polímero estabilizados con nanopartículas que contienen micelas inversas se utilizan para administrar uno o una pluralidad de agentes inmunomoduladores (Figura 8). Mediante la adsorción de nanopartículas pequeñas (1 nm - 30 nm) en la superficie de un nanotransportador de liposoma-polímero, el nanotransportador no solo tiene la ventaja de los liposomas estabilizados mediante nanopartículas anteriormente mencionados (Figura 4) y de las nanopartículas de liposoma-polímero que contienen micelas inversas anteriormente mencionadas (Figura 7), sino también una rigidez ajustable de la membrana y una estabilidad controlable del liposoma.

Nanotransportador polimérico estabilizado con una monocapa lípida

Este es un ejemplo comparativo. Los nanotransportadores poliméricos estabilizados con una monocapa lípida se usan para administrar uno o una pluralidad de agentes inmunomoduladores (Figure 9). En comparación con el transportador de liposoma-polímero anteriormente mencionado (Figuras 5-8), este sistema tiene la ventaja de la simplicidad en lo que respecta tanto a los agentes como a la fabricación. Un homopolímero hidrófobo puede constituir el núcleo polimérico, a diferencia del copolímero dibloque usado en las Figuras 5-8, que tiene segmentos tanto hidrófobos como hidrófilos. Los nanotransportadores poliméricos estabilizados con lípidos se pueden formar en una sola etapa en lugar de formular las nanopartículas poliméricas y los liposomas por separado, seguido por su fusión entre sí.

Una molécula hidrófila inmunomoduladora se conjuga químicamente en primer lugar con un grupo de cabeza lípido. El conjugado se mezcla con una proporción determinada de moléculas lípidas no conjugadas en una solución acuosa que contiene uno o más disolventes miscibles con agua. Un material polimérico biodegradable se mezcla con los agentes inmunomoduladores hidrófobos para su encapsulación en un disolvente orgánico miscible con el agua o parcialmente miscible con el agua. La solución polimérica resultante se añade a la solución acuosa de lípido conjugado y no conjugado para producir nanopartículas mediante la difusión rápida del disolvente orgánico en el agua y la evaporación del disolvente orgánico.

Nanotransportador polimérico estabilizado con una monocapa lípida que comprende micelas inversas

Este es un ejemplo comparativo. Las nanopartículas poliméricas estabilizadas con una monocapa lípida que comprenden micelas inversas se utilizan para administrar uno o una pluralidad de agentes inmunomoduladores (Figura 10). Puesto que los nanotransportadores poliméricos estabilizados con lípidos (Figura 9) están limitados a transportar agentes inmunomoduladores hidrófobos, en este caso, se formulan micelas pequeñas (1 nm - 20 nm) inversas par encapsular agentes inmunomoduladores hidrófilos y mezclarlos con copolímeros biodegradables para formular los núcleos de nanotransportadores poliméricos.

Ejemplo 3: Direccionamiento in vivo de SCS-Mph usando fragmentos Fc procedentes de IgG humana

Este es un ejemplo comparativo. Nanopartículas de control no modificadas fluorescentes (panel superior, *Figura 24A*) o nanopartículas dirigidas conjugadas a la superficie de Fc (panel intermedio e inferior, *Figura 24A*) se inyectaron en las almohadillas plantares de ratones anestesiados, y los ganglios linfáticos poplíteales drenantes se extirparon 1 hora después, y se prepararon suspensiones de células únicas para citometría de flujo. Las nanopartículas dirigidas también se inyectaron a los ratones una semana después de que los macrófagos de los ganglios linfáticos se hubieran agotado mediante una inyección de liposomas que contenían clodronato (panel inferior, *Figura 24A*). Las poblaciones celulares de los compartimentos se identificaron como macrófagos asociados a nanopartículas en función de la expresión elevada de CD11b. Estos resultados indican que (i) la unión de las nanopartículas depende de la presencia de macrófagos sensibles a clodronato y (ii) las nanopartículas dirigidas se unen dos veces como muchos macrófagos como nanopartículas de control.

Los paneles de la derecha de la *Figura 24* muestran micrografías fluorescentes de secciones congeladas de ganglios linfáticos tras inyección de nanopartículas de control de color azul fluorescente (panel superior, *Figura 24A*) o dirigidas (paneles intermedio e inferior, *Figura 24A*). Las secciones se contratiñeron con anti-CD169 y un marcador que identifica la médula (en el panel superior e inferior, *Figura 24A*) o linfocitos B (en el panel intermedio, *Figura 24A*). Una hora después de la inyección de nanopartículas, la mayoría de partículas de control se encuentran en la médula (parte superior, *Figura 24A*), mientras que las nanopartículas dirigidas se sitúan simultáneamente con CD169+ SCS-Mph adyacentes a los folículos de linfocitos B (parte central, *Figura 24A*). 24 horas después de la inyección, se observan acumulaciones de tamaño celular discretas de nanopartículas dirigidas en la región cortical entre el SCS y la médula, lo que sugiere la captación y el transporte mediante células dendríticas migratorias.

Los ratones recibieron una inyección i.v. con linfocitos B de fluorescencia roja en una almohadilla plantar con una mezcla 1:1 de nanopartículas de control y dirigidas contra Fc. A las 24 horas, cuando parte de los linfocitos B transferidos habían migrado hasta los folículos de linfocitos B, los ganglios linfáticos popliteales drenantes se extirparon y se seccionaron para su estudio mediante microscopía confocal y análisis cuantitativo de imágenes de cocientes de fluorescencia verde:azul. La región del seno subcapsular (SCS) contenía niveles similares de nanopartículas azules y verdes (células rodeadas a la derecha, *Figura 24B*), mientras que la fluorescencia verde asociada a las nanopartículas dirigidas a Fc era aproximadamente dos veces mayor en el SCS. Se produjeron también importantes acumulaciones de nanopartículas verdes dentro de los folículos de linfocitos B delineados por los linfocitos B rojos dispersos. Estas regiones tienen el tamaño, forma, y distribución características de las células dendríticas foliculares (FDC), mientras que se sabe que los macrófagos y células dendríticas análogos expresan abundantemente los receptores Fc.

Ejemplo 4: Las nanopartículas dirigidas que contienen antígenos son muy inmunógenas e inducen elevados títulos de anticuerpos

Este es un ejemplo comparativo. Grupos de ratones (5/grupo) se inmunizaron con: virus de la estomatitis vesicular inactivado mediante UV (VSV, serotipo Indiana) o con la glicoproteína de la envoltura inmunógena purificada (VSV-G) de VSV. VSV-G se administra bien en forma soluble mezclada con alumbre o conjugada con nanopartículas de PLGA dirigidas o no dirigidas con o sin alumbre como adyuvante. Se ha estimado que la dosis de VSV-G libre era ~10 veces mayor que la dosis de VSV-G administrada con nanopartículas. Los ratones recibieron una inyección de refuerzo el día 55 tras la inmunización primaria, y se obtuvo suero después de 10 semanas y se sometieron a neutralización por formación de placas mediada por VSV sobre células Vero. Los resultados muestran títulos como la mayor dilución en suero que bloquea la formación de placas en al menos un 50 %. Cada símbolo refleja el título neutralizante anti-VSV en un ratón. El grupo de ratones inmunizados con VSV-G presentado sobre nanopartículas dirigidas a Fc generó una cantidad significativamente mayor de títulos neutralizantes anti-VSV que cualquier otro grupo (los dos animales con los títulos más altos de dicho grupo neutralizaron completamente la formación de placas a la dilución más alta ensayada, por lo que los títulos reales pueden ser incluso mayores).

La respuesta inmunitaria inducida desencadenada por las vacunas de nanopartículas (NP) confiere una protección potente de una dosis letal de VSV. Aunque todos los grupos vacunados mostraron cierto grado de protección, solamente el grupo que recibió VSV-G conjugado con NP dirigidas a Fc más alumbre mostraron un 100 % de protección de la infección letal. Los receptores de VSV-G libre (VSV-G + alum) recibieron ~ 10 veces más antígeno que los animales que recibieron VSV-G conjugado a nanopartículas. Como control negativo, un grupo de ratones recibió nanopartículas dirigidas a Fc (NP-Fc) sin VSV-G, que no produjo protección.

Ejemplo 5: Activación de linfocitos T in vivo mediante nanopartículas inmunomoduladoras

Los ratones C57BL6J recibieron una inyección i.v. con linfocitos T CD4 marcados con CFSE procedentes de ratones OT-II donantes, que expresan un receptor de linfocitos T (TCR) transgénico de la ovoalbúmina (OVA) de pollo presentado en MHC de clase II. Posteriormente, se llevaron a cabo experimentos de inmunización mediante la inyección en una almohadilla plantar de OVA libre o nanopartículas compuestas de PLA o PLGA que encapsulaban una cantidad equivalente de OVA como antígeno modelo. Todas las mezclas antigénicas también contenían CpG (un agonista de TLR9) como adyuvante. Los animales se inyectaron, se sacrificaron tres días después de la inmunización, y se evaluó la activación de linfocitos T OT-II mediante citometría de flujo en suspensiones de una sola célula de diferentes tejidos.

Los linfocitos T no estimulados marcados con el éster de 5,6-carboxi-succinimidil-fluoresceína (CFSE) no se dividen y, por lo tanto, llevan una concentración uniformemente elevada de CFSE dando como resultado un único pico estrecho de células fluorescentes brillantes. Por el contrario, los linfocitos T activados se dividen y, en el proceso, dividen el colorante fluorescente uniformemente entre las dos células hijas, dando como resultado una disminución gradual en intensidad de fluorescencia tras cada división sucesiva. De este modo, cuanto mayor sea la desviación a la izquierda en CFSE, más intensamente se activaron los linfocitos T. Los resultados indican que: (i) el antígeno encapsulado en las nanopartículas generó una respuesta de los linfocitos T CD4 más potente que el antígeno libre en los ganglios linfáticos popliteales drenantes (popLN, fila superior); (ii) solo nanopartículas, pero sin OVA libre, indujo una proliferación de linfocitos T en los tejidos linfoides distales, incluidos el ganglio linfático braquial (fila intermedia) y del bazo (fila inferior). En receptores de OVA libre, el LN braquial y del bazo contenía solamente

células sin dividir, o células con un contenido de CFSE muy bajo. La última población no indica la activación de linfocitos T locales sino la migración de linfocitos T que fueron activados en otra parte.

5 Los ratones C57BL6J recibieron una inyección i.v. con linfocitos T CD8 marcados con CFSE procedentes de ratones OT-I donantes, que expresan un receptor de linfocitos T (TCR) transgénico de la ovoalbúmina (OVA) de pollo presentado en MHC de clase I. El protocolo experimental fue idéntico, por otra parte, al descrito anteriormente.

10 Los ratones C57BL6J recibieron una inyección i.v. con linfocitos T CD8 marcados con CFSE procedentes de ratones OT donantes como anteriormente. Sin embargo, en este experimento CL097, un compuesto de imidazoquinolina que activa TLR-7 y TLR-8, se usó como adyuvante, y se sometieron a ensayo diferentes métodos de administración de adyuvante. La activación de linfocitos T, en este caso, se evaluó contando el número total de linfocitos T OT-I en el ganglio linfático popliteal drenante tres días después de la inyección en la almohadilla plantar bien de OVA libre (1 µg o 100 ng) mezclado con adyuvante libre (160 ng). A todas los animales que recibieron las nanopartículas se administraron 100 ng de OVA con o sin 160 ng de CL097. El material que se había encapsulado dentro de las nanopartículas, pero que no se había unido covalentemente con el polímero PLA se muestra en []. La unión covalente de CL097 a PLA se identifica por un guion. Los materiales que se mezclaron en forma libre dentro del mismo compartimiento se separan con "+". Estos resultados revelaron un importante aumento en la proliferación de linfocitos T CD8 en los animales que recibieron OVA encapsulado en nanopartículas en las que el adyuvante estaba unido covalentemente al excipiente.

15

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Nanotransportadores que tienen un diámetro medio geométrico comprendido entre 50 nm y 500 nm, siendo los nanotransportadores poliméricos y comprendiendo un antígeno peptídico de linfocitos B y un agente inmunoestimulador;
 en donde el agente inmunoestimulador es un agonista del receptor de tipo toll;
 en donde los nanotransportadores comprenden un polímero seleccionado entre el grupo que consiste en: poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) y poli(ácido láctico/ácido glicólico) (PLGA); y,
 10 en donde el agente inmunoestimulador está unido covalentemente a los nanotransportadores o a un polímero a partir del que se forman los nanotransportadores, y el antígeno peptídico de linfocitos B está encapsulado.
2. Los nanotransportadores de la reivindicación 1, en los que el antígeno peptídico de linfocitos B es un antígeno de una enfermedad infecciosa o un antígeno del cáncer.
- 15 3. Los nanotransportadores de las reivindicaciones 1 o 2, en los que el polímero es PLGA y tiene una proporción de ácido láctico:ácido glicólico de 85:15, de aproximadamente 75:25, de aproximadamente 60:40, de aproximadamente 50:50, de aproximadamente 40:60, de aproximadamente 25:75 o de aproximadamente 15:85.
- 20 4. Los nanotransportadores de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los nanotransportadores comprenden además un agente de direccionamiento.
5. Los nanotransportadores de la reivindicación 4, en los que el agente de direccionamiento dirige a los nanotransportadores a las células presentadoras de antígeno, linfocitos T o linfocitos B.
- 25 6. Los nanotransportadores de la reivindicación 5, en los que la células presentadora de antígeno es: una célula dendrítica; una célula dendrítica folicular; o un macrófago, por ejemplo, un macrófago del seno subcapsular.
7. Los nanotransportadores de la reivindicación 6, en los que el agente de direccionamiento es para una molécula seleccionada entre el grupo que consiste en CD11b, CD169, receptor de manosa, DEC-205, CD11c y CD21/35.
- 30 8. Los nanotransportadores de las reivindicaciones 6 o 7, en los que el agente de direccionamiento está unido covalentemente a los nanotransportadores o los polímeros que forman los nanotransportadores.
9. Los nanotransportadores de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los nanotransportadores tienen un potencial zeta positivo.
- 35 10. Los nanotransportadores de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el nanotransportador se forma mediante autoensamblado.
- 40 11. Un método para preparar los nanotransportadores de cualquier reivindicación anterior mediante nanoprecipitación, centrado de flujo usando canales de fluido, secado por pulverización, evaporación en disolvente mediante emulsión única y doble, o extracción con disolventes.
- 45 12. Los nanotransportadores de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de un individuo que lo necesita provocando una respuesta inmunitaria.
13. Los nanotransportadores para el uso de la reivindicación 12, en donde el individuo necesita vacunación o donde el individuo tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa o cáncer.
- 50 14. Los nanotransportadores de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en la redirección del sistema inmunitario desde una respuesta Th1 a una respuesta Th2.

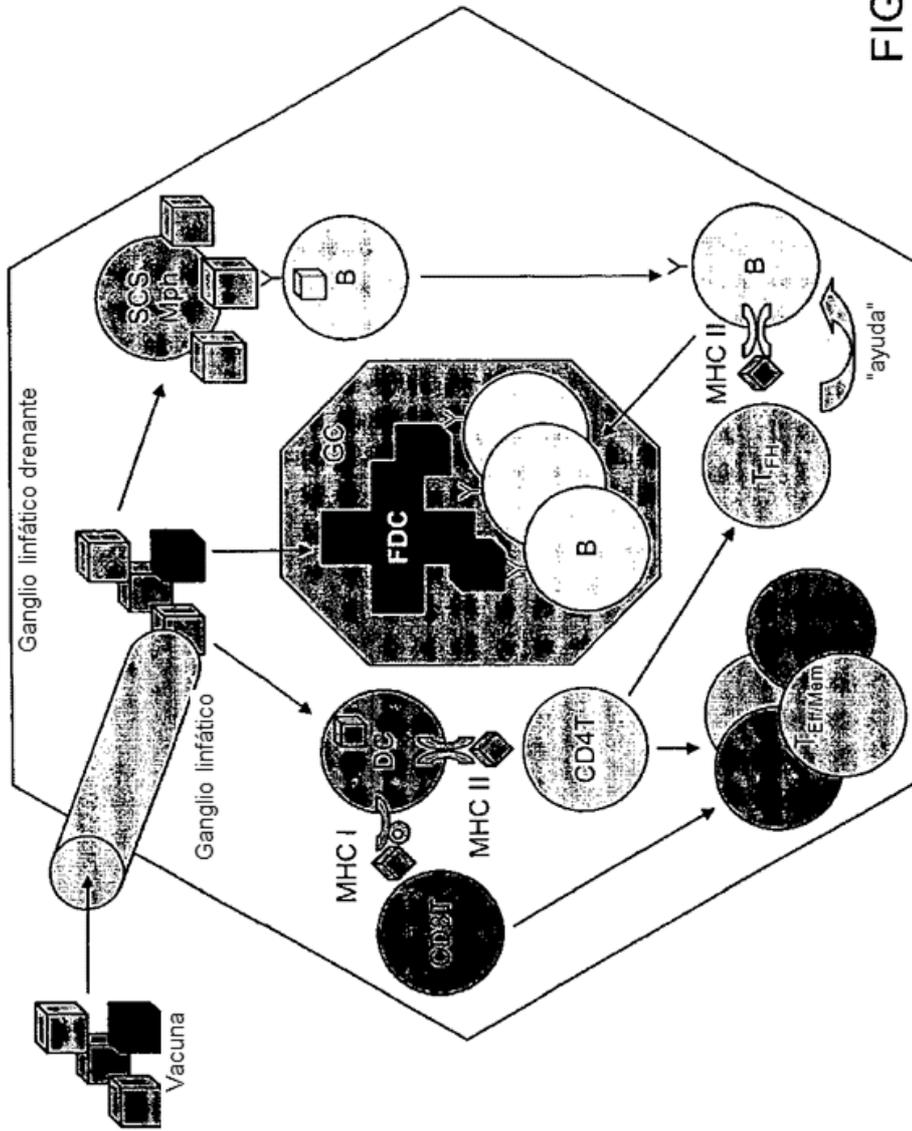


FIG. 1

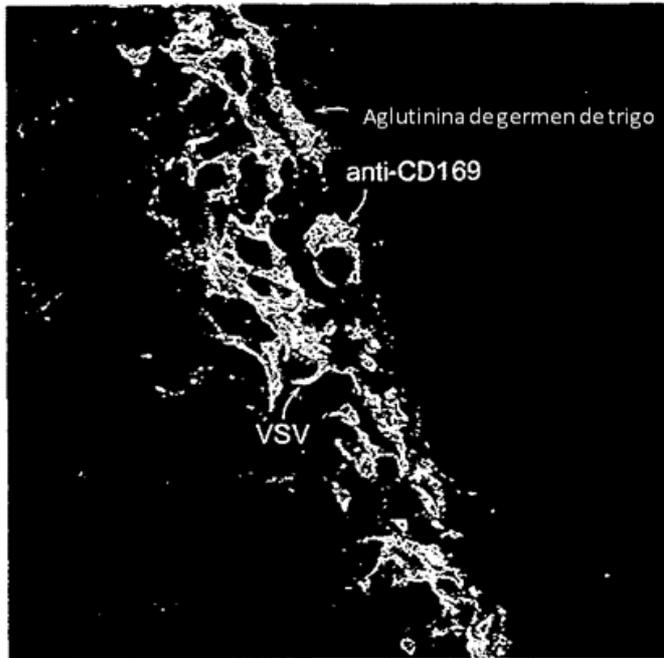
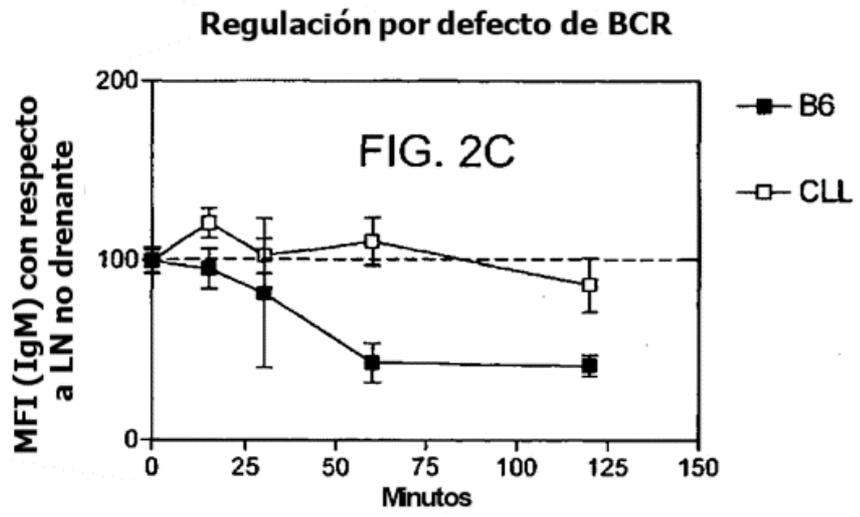


FIG. 2A



FIG. 2B



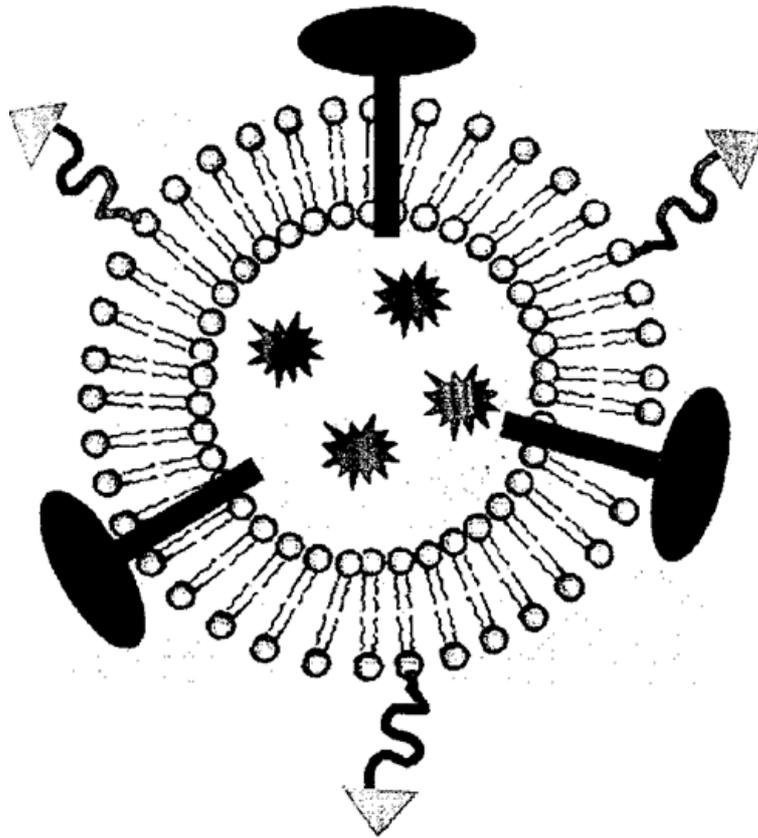


FIG. 3

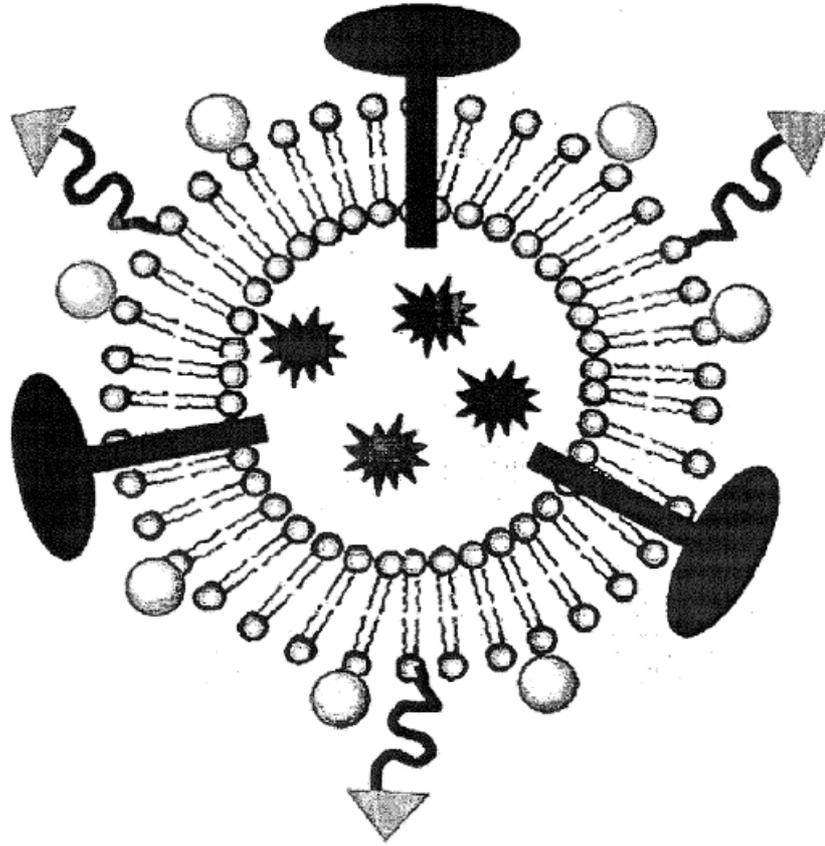


FIG. 4

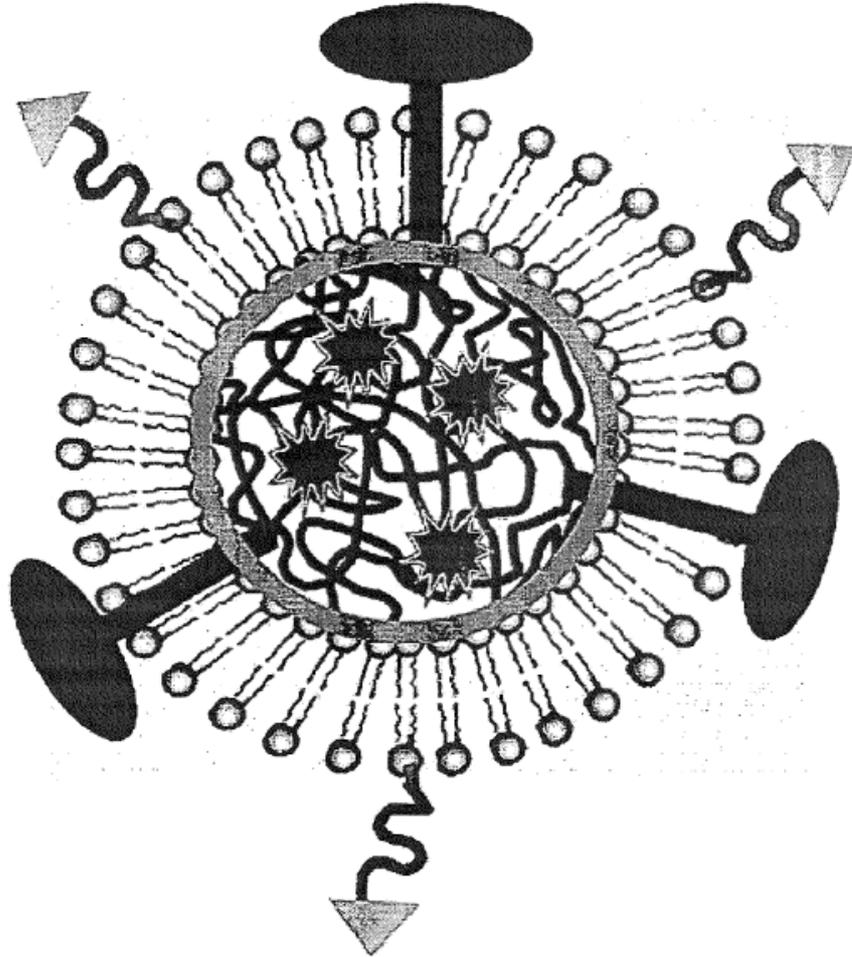


FIG. 5

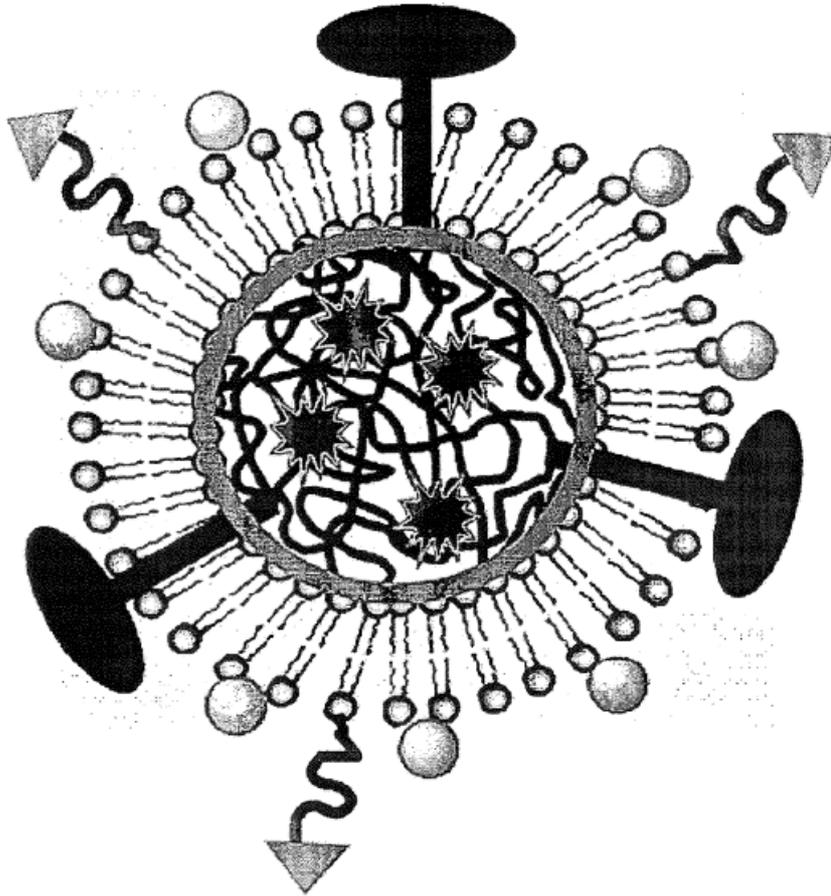


FIG. 6

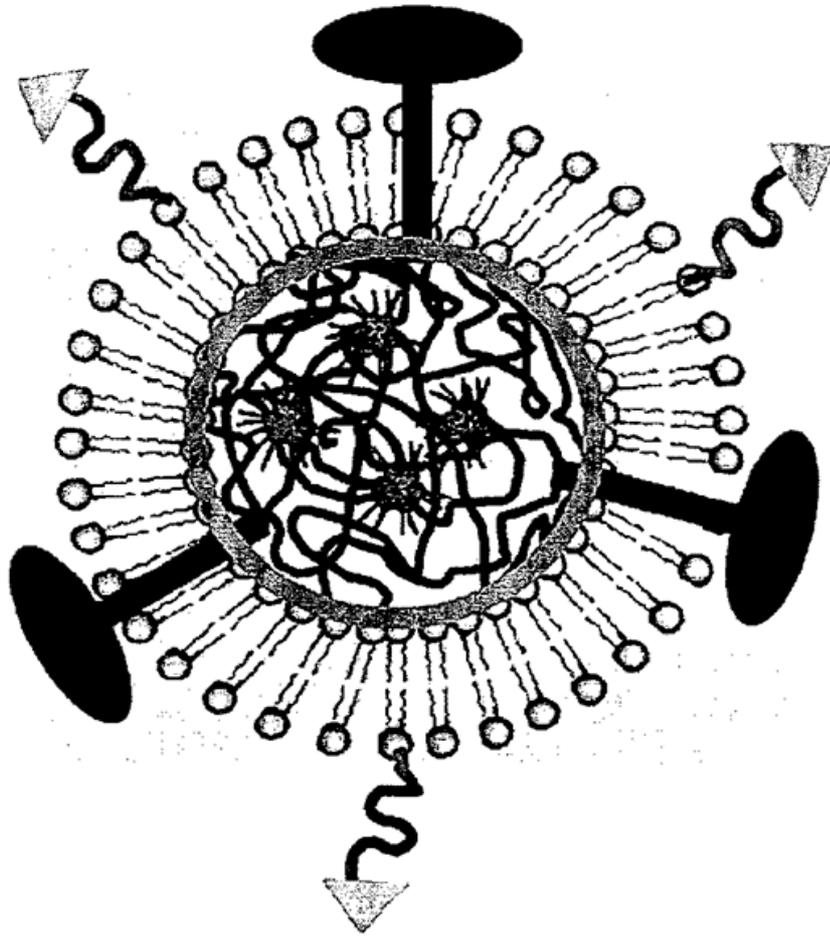


FIG. 7

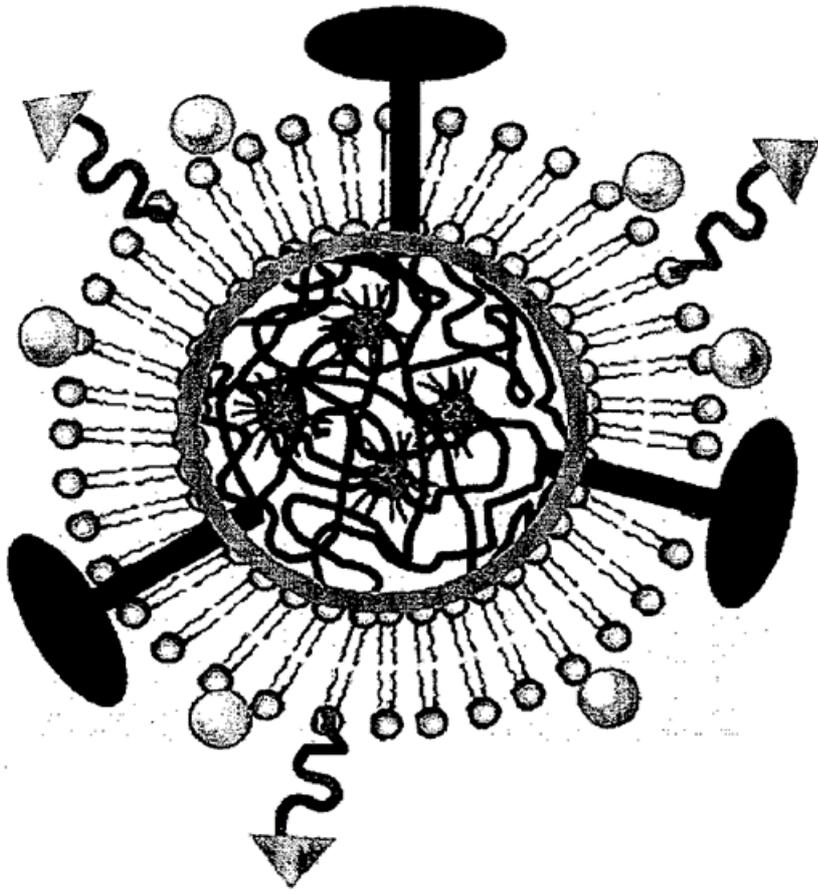


FIG. 8

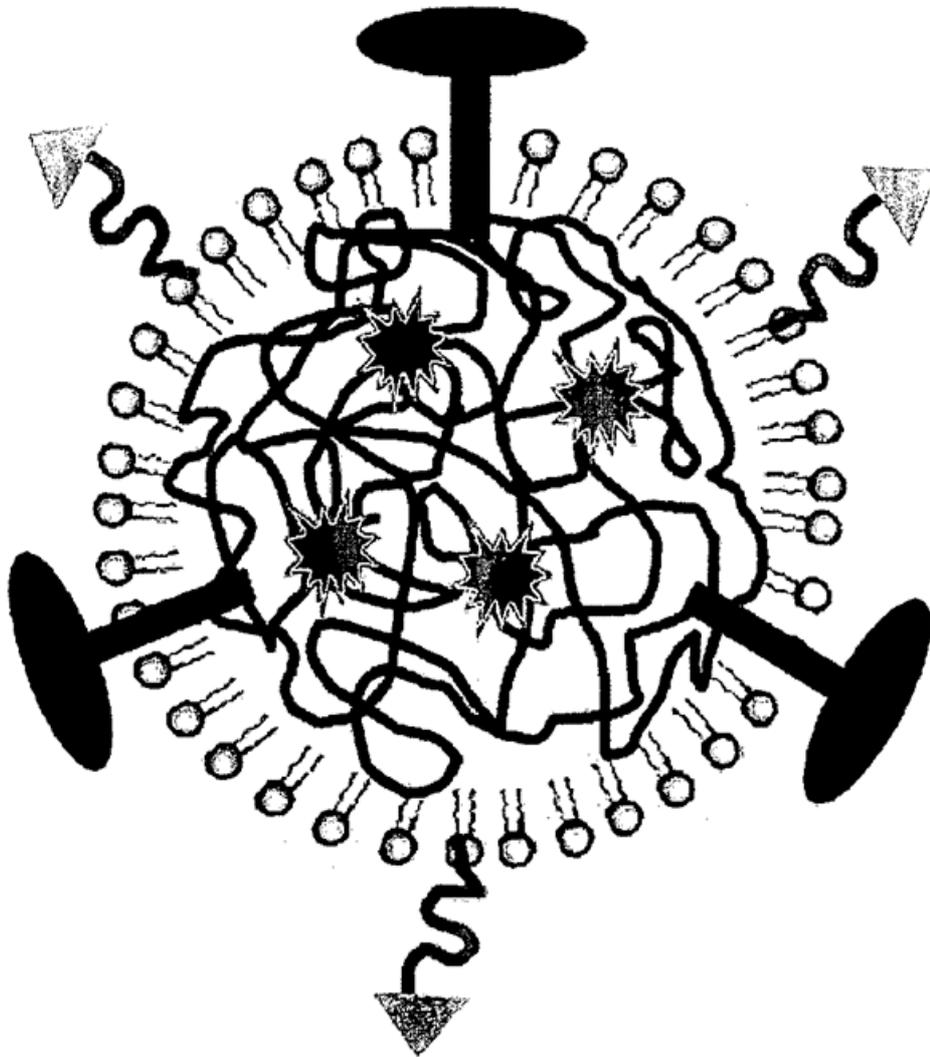


FIG. 9

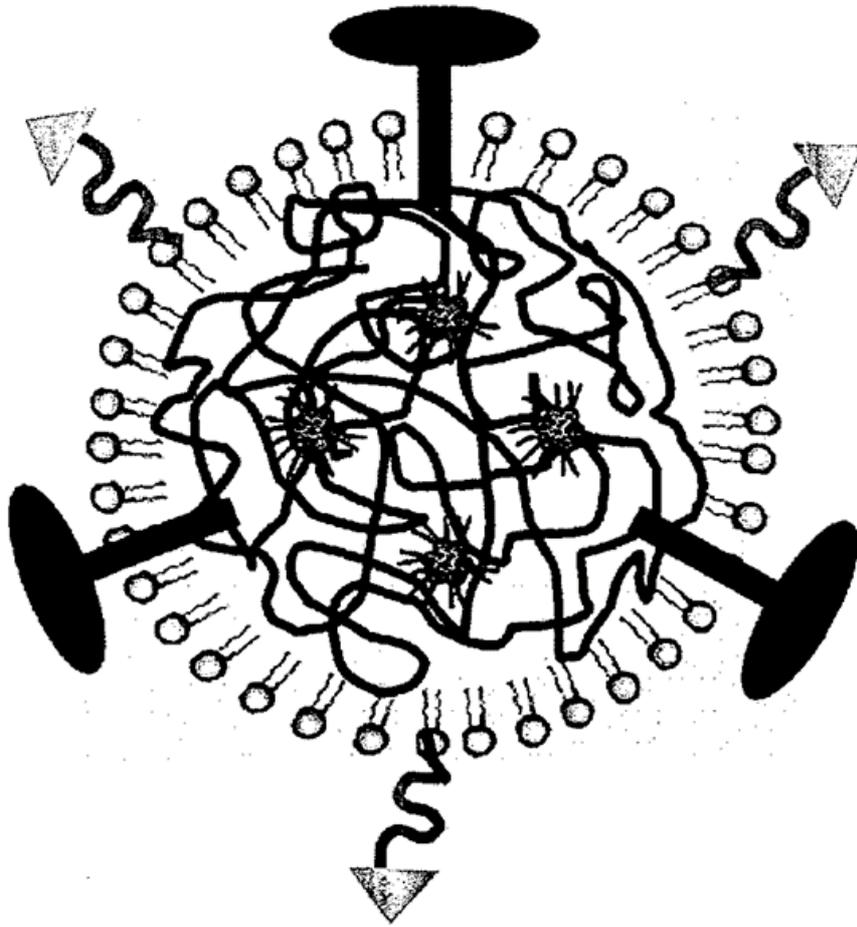
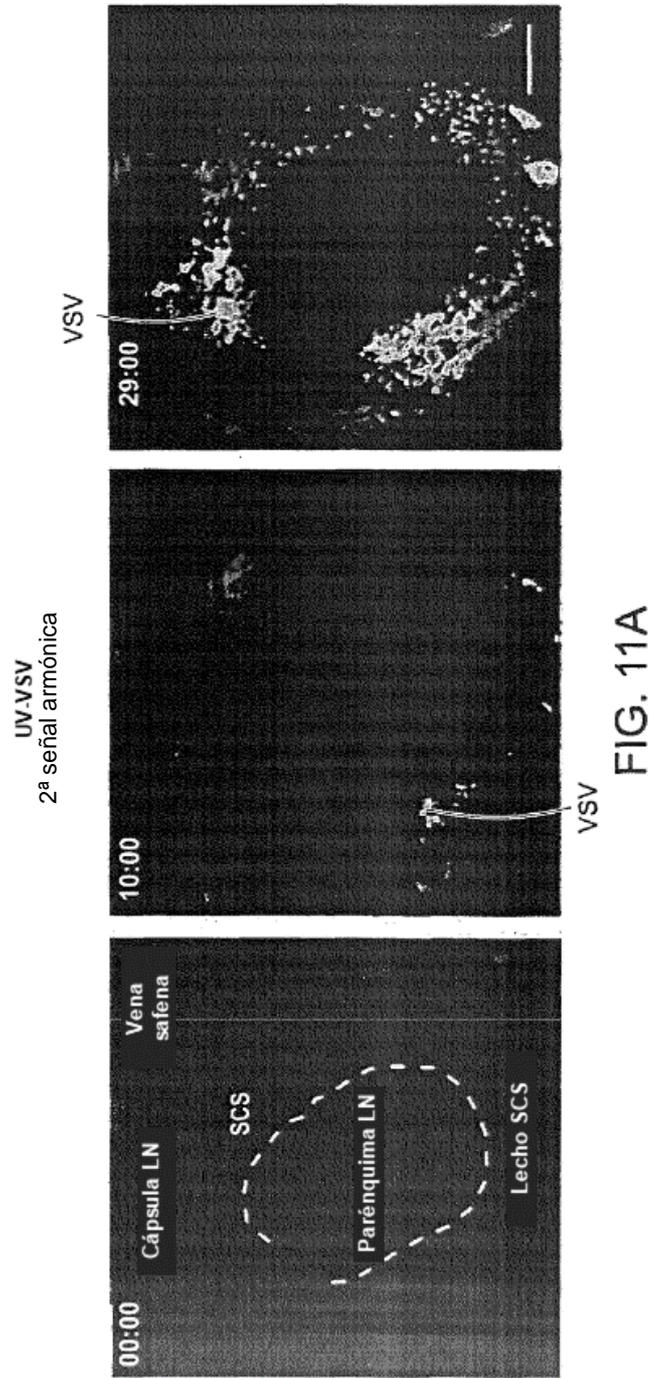


FIG. 10



UV-VSV-IND
EGFP
2ª señal armónica

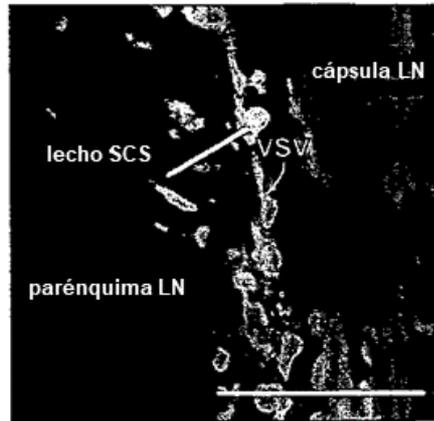


FIG. 11B

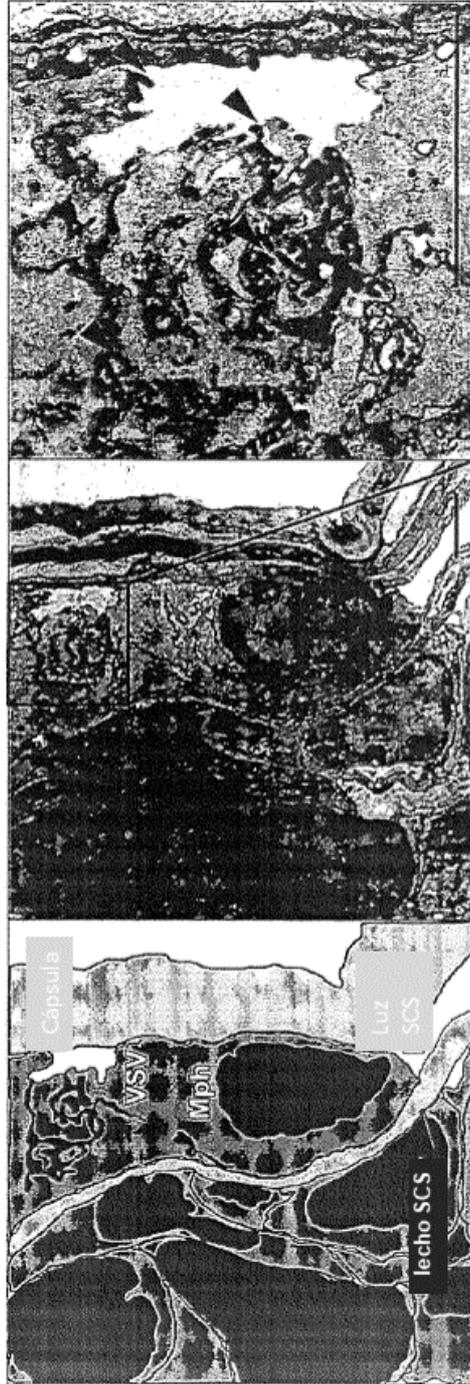


FIG. 11C

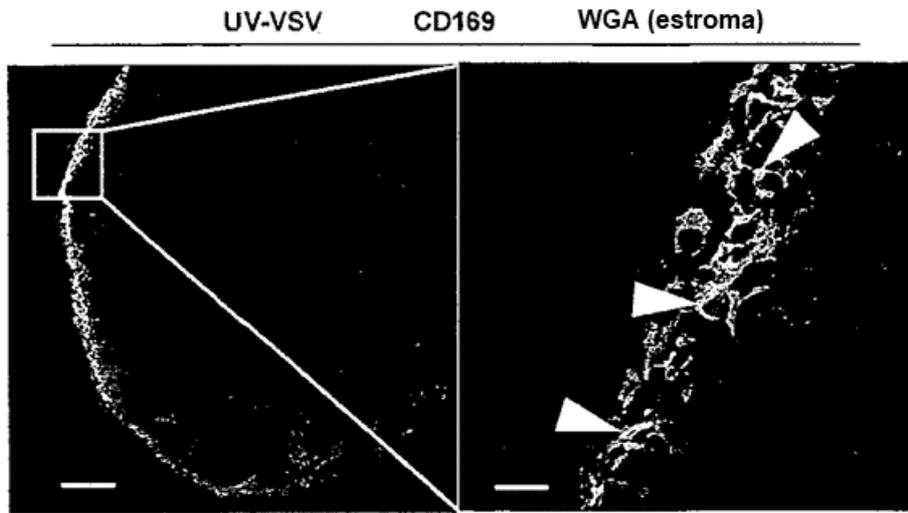


FIG. 11D

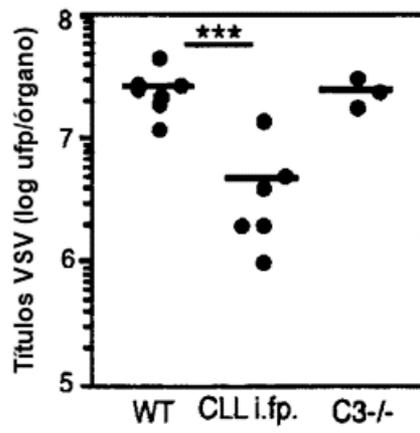


FIG. 11E

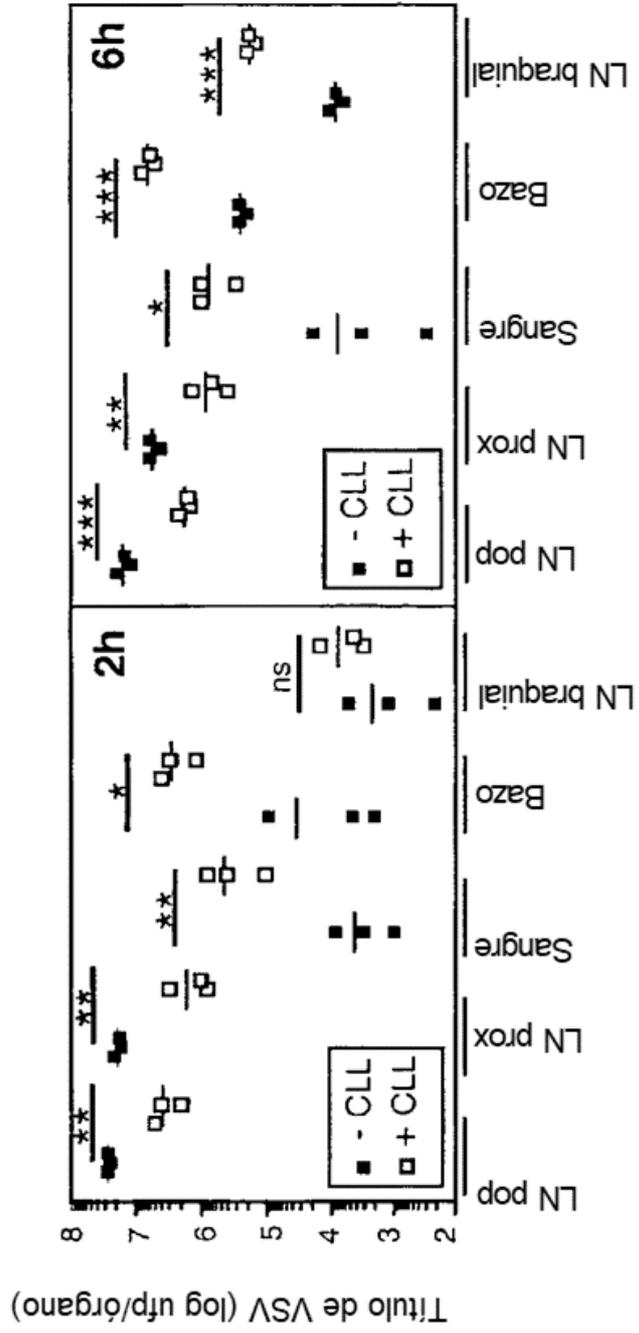


FIG. 11G

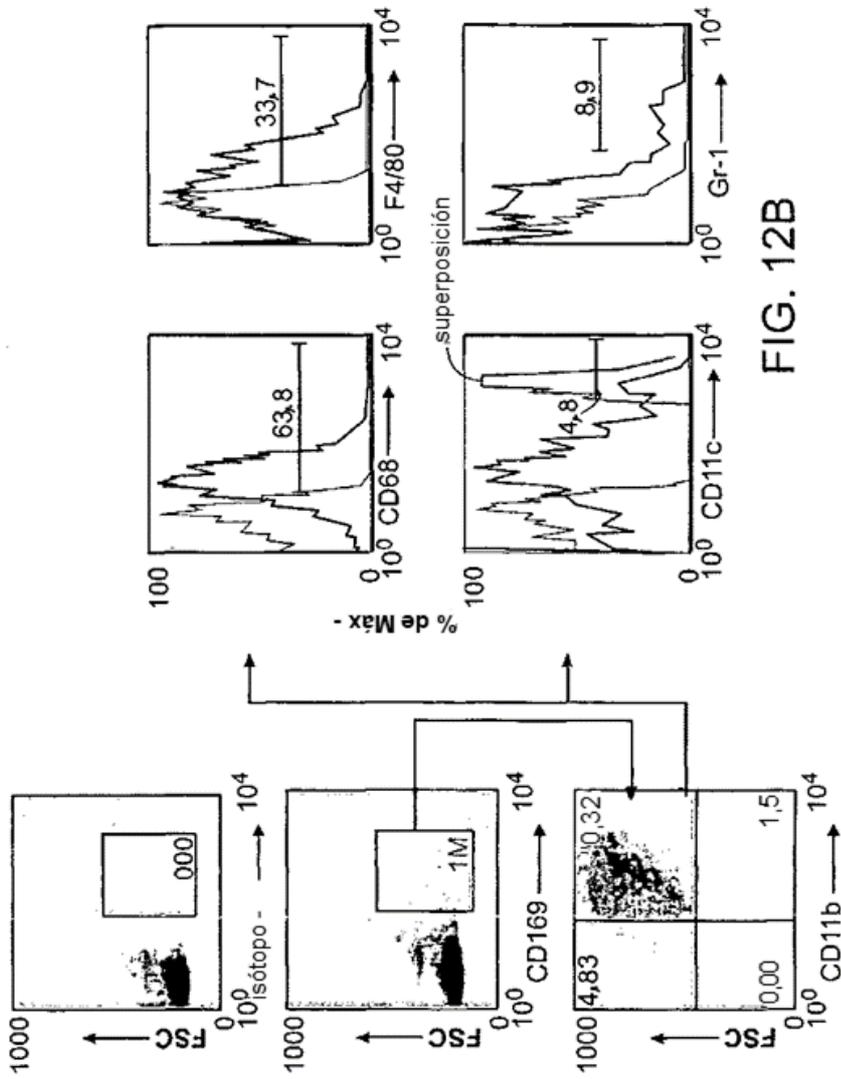


FIG. 12A

FIG. 12B

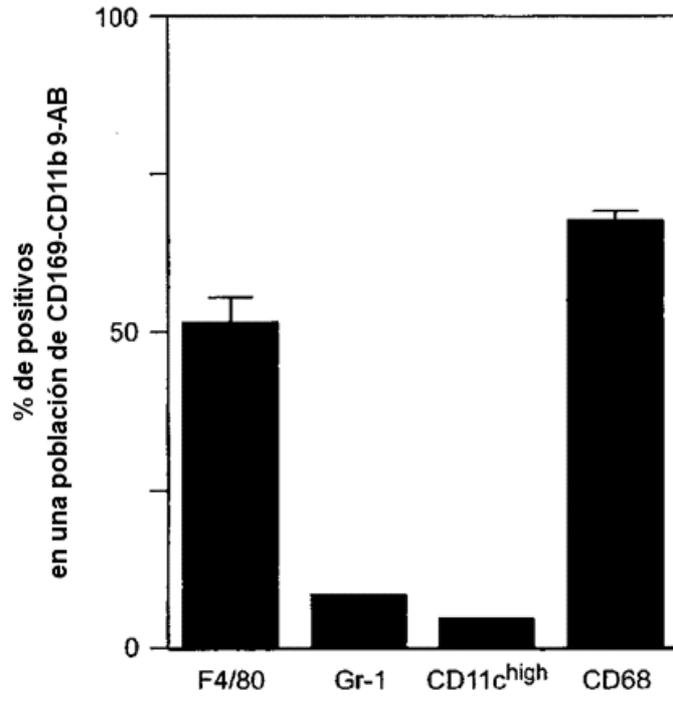
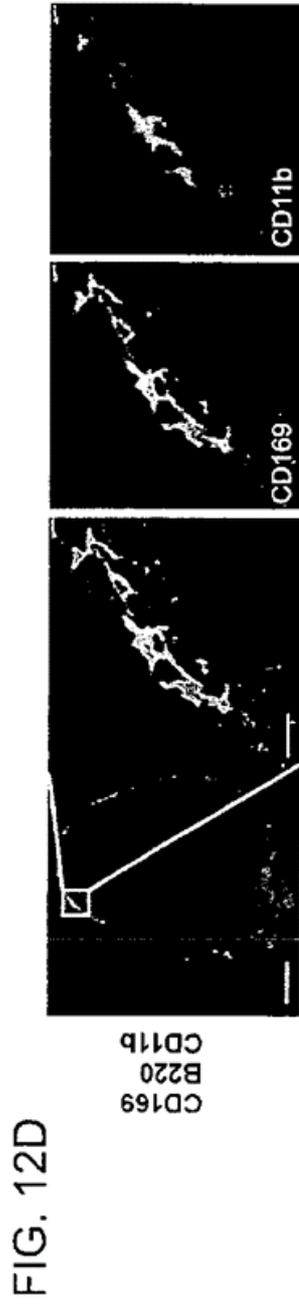


FIG. 12C



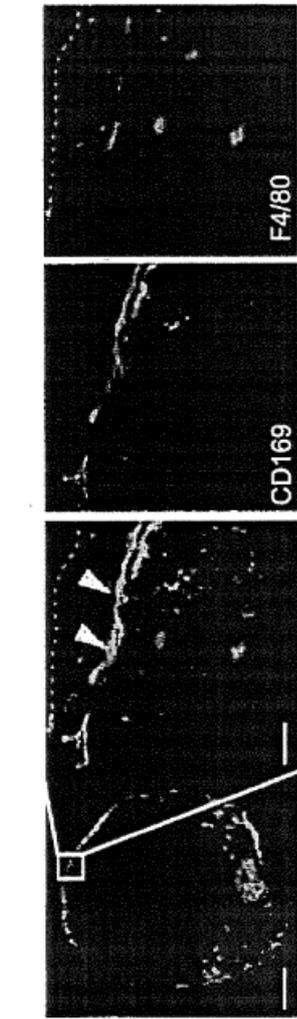


FIG. 12F
CD169
B220
F4/80

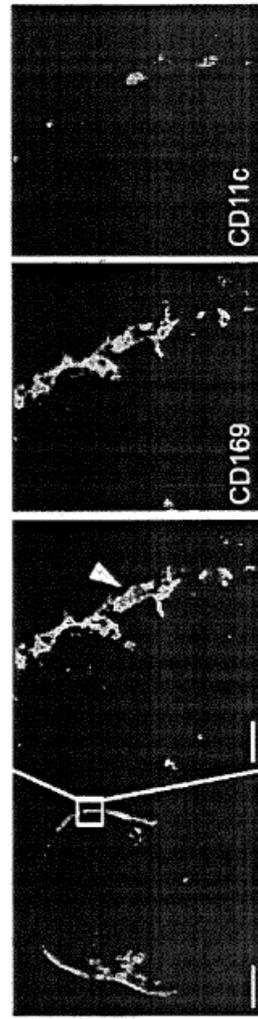


FIG. 12G
CD169
B220
CD11c

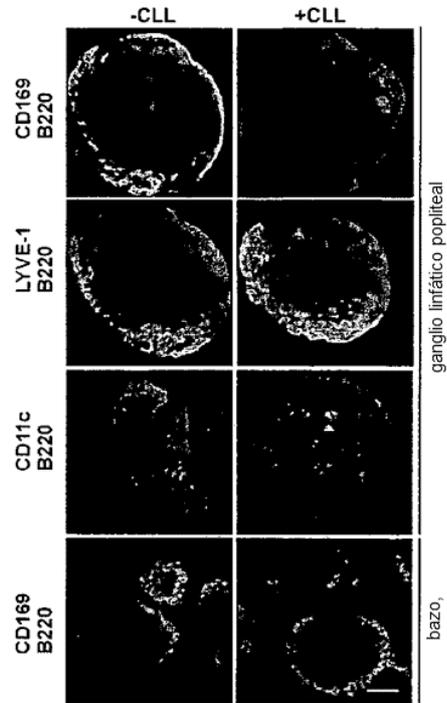


FIG. 13A

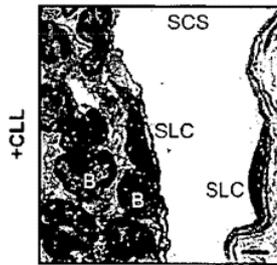


FIG. 13E

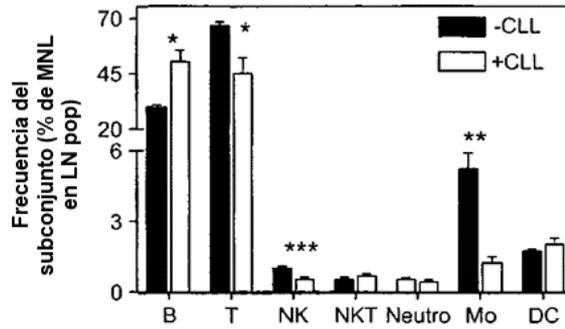


FIG. 13B

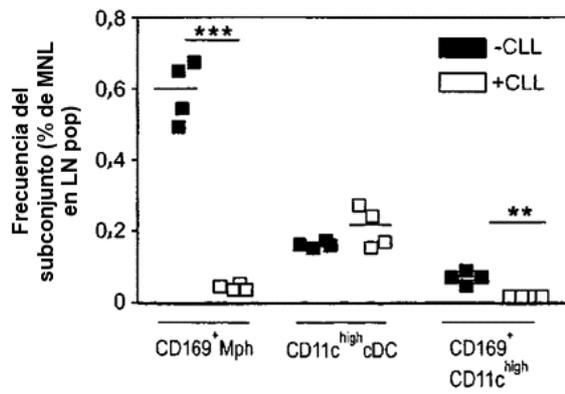


FIG. 13C

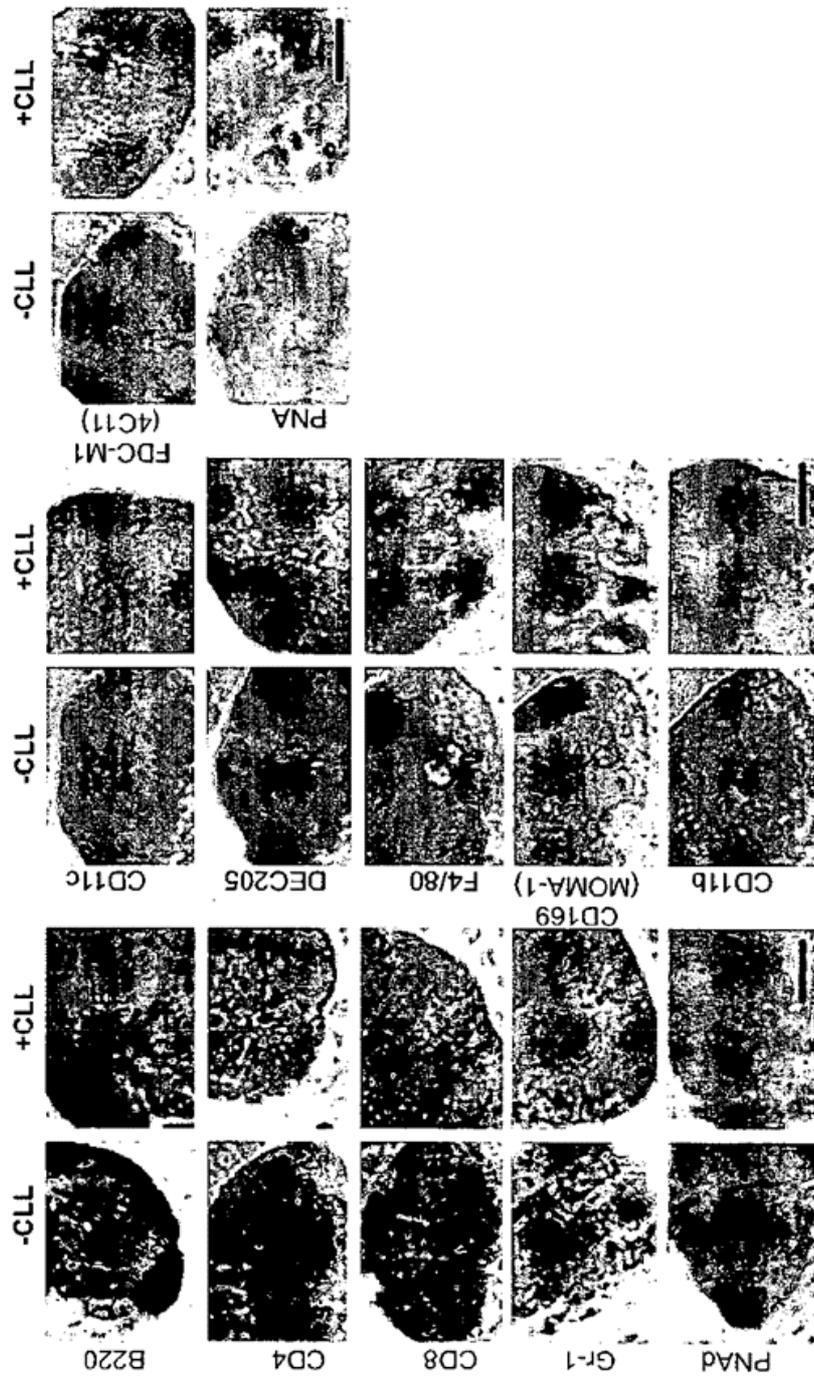


FIG. 13D

FIG. 14A

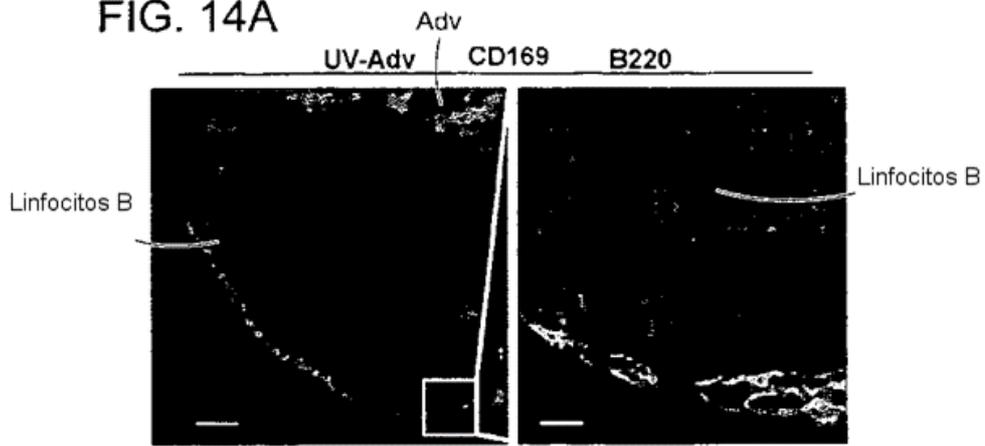


FIG. 14C

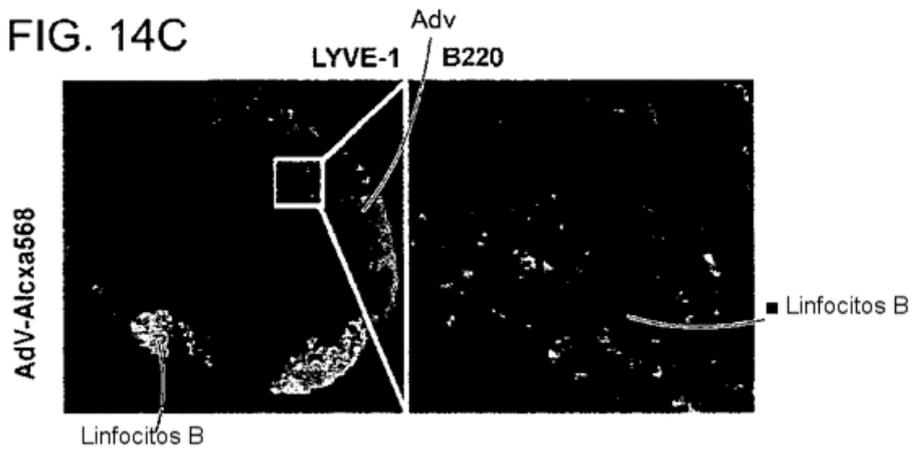
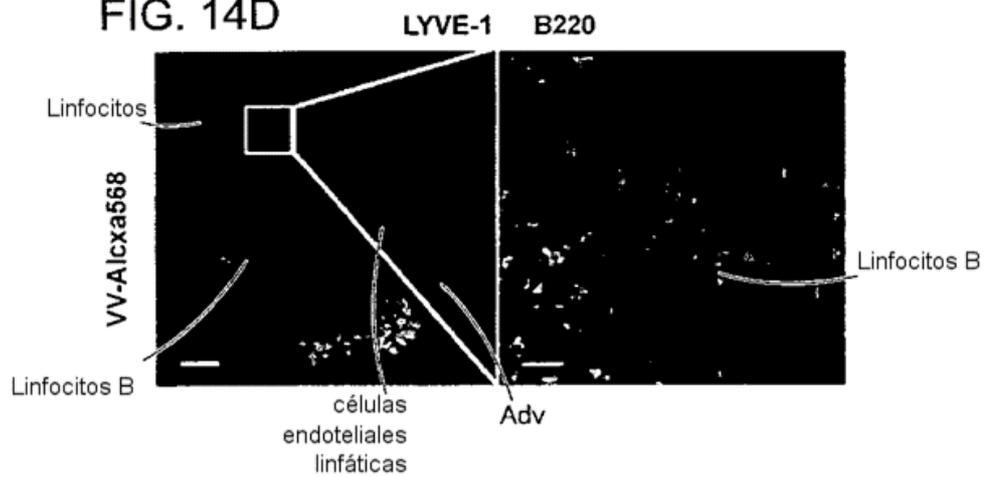
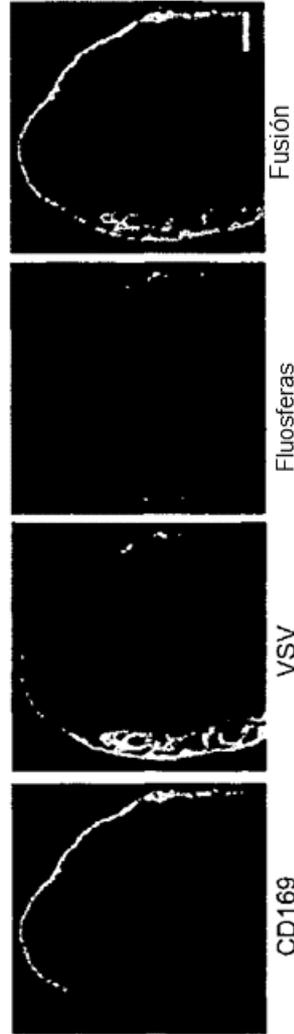
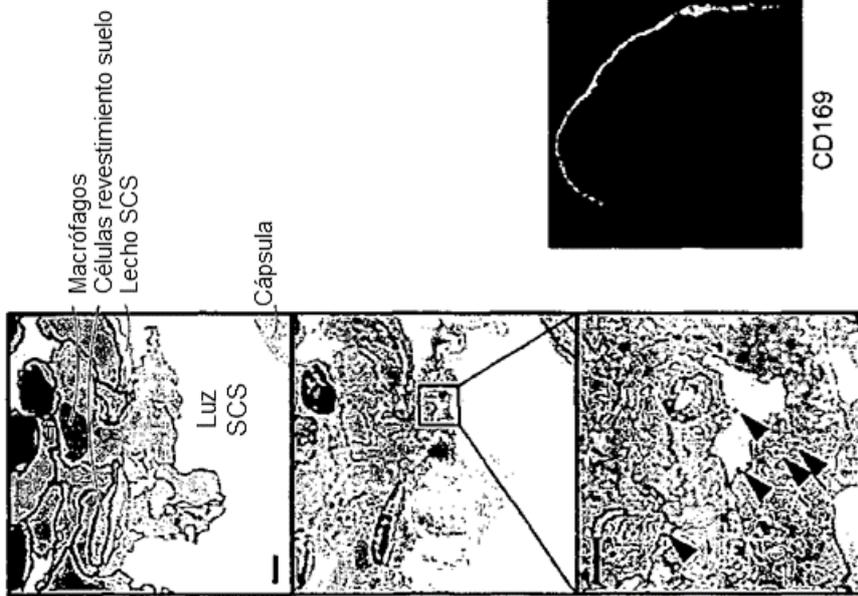
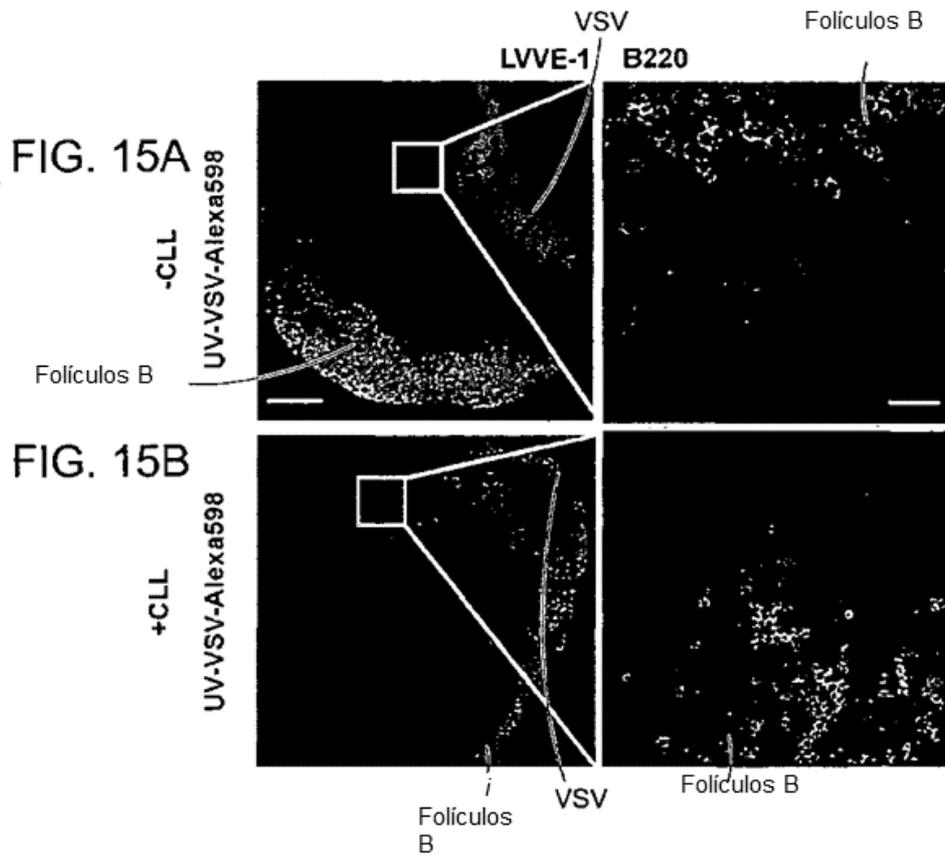


FIG. 14D







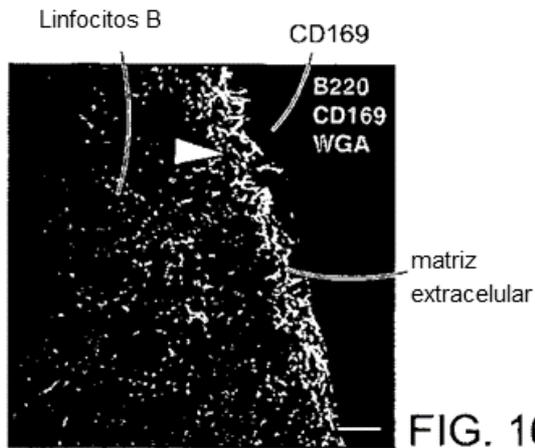


FIG. 16A



FIG. 16B

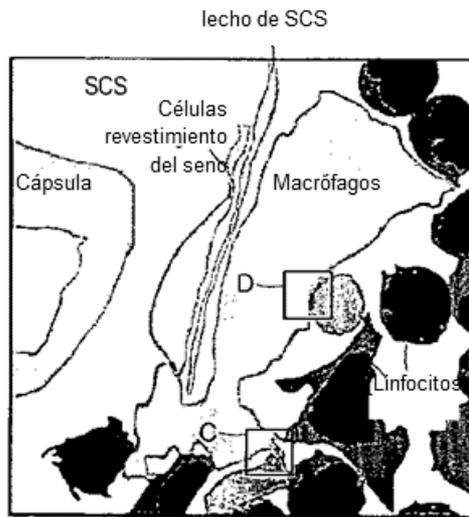


FIG. 16C

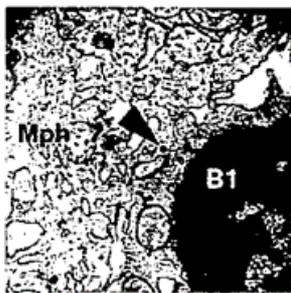


FIG. 16D



FIG. 16E

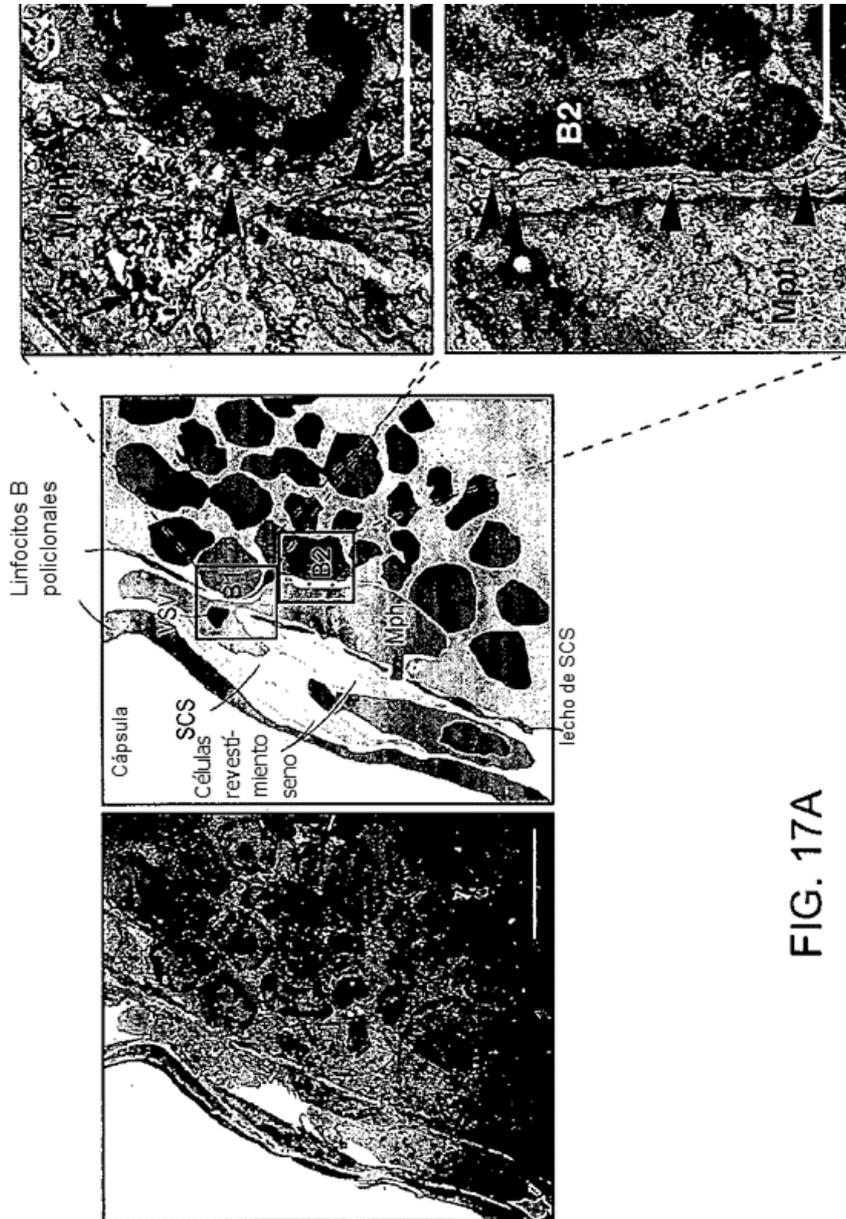


FIG. 17A

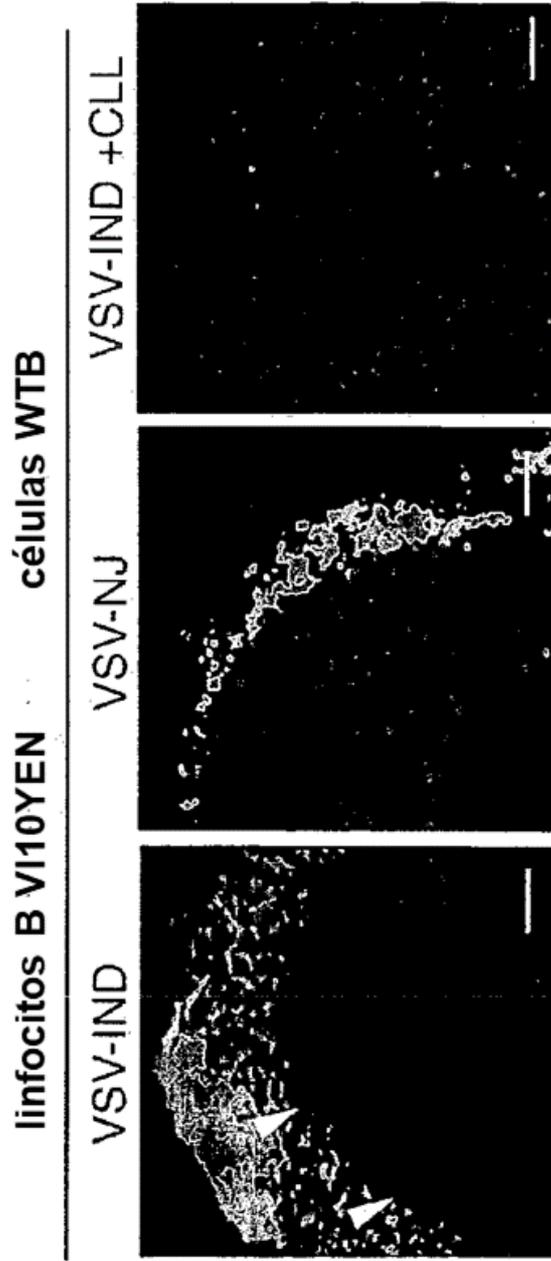


FIG. 17B

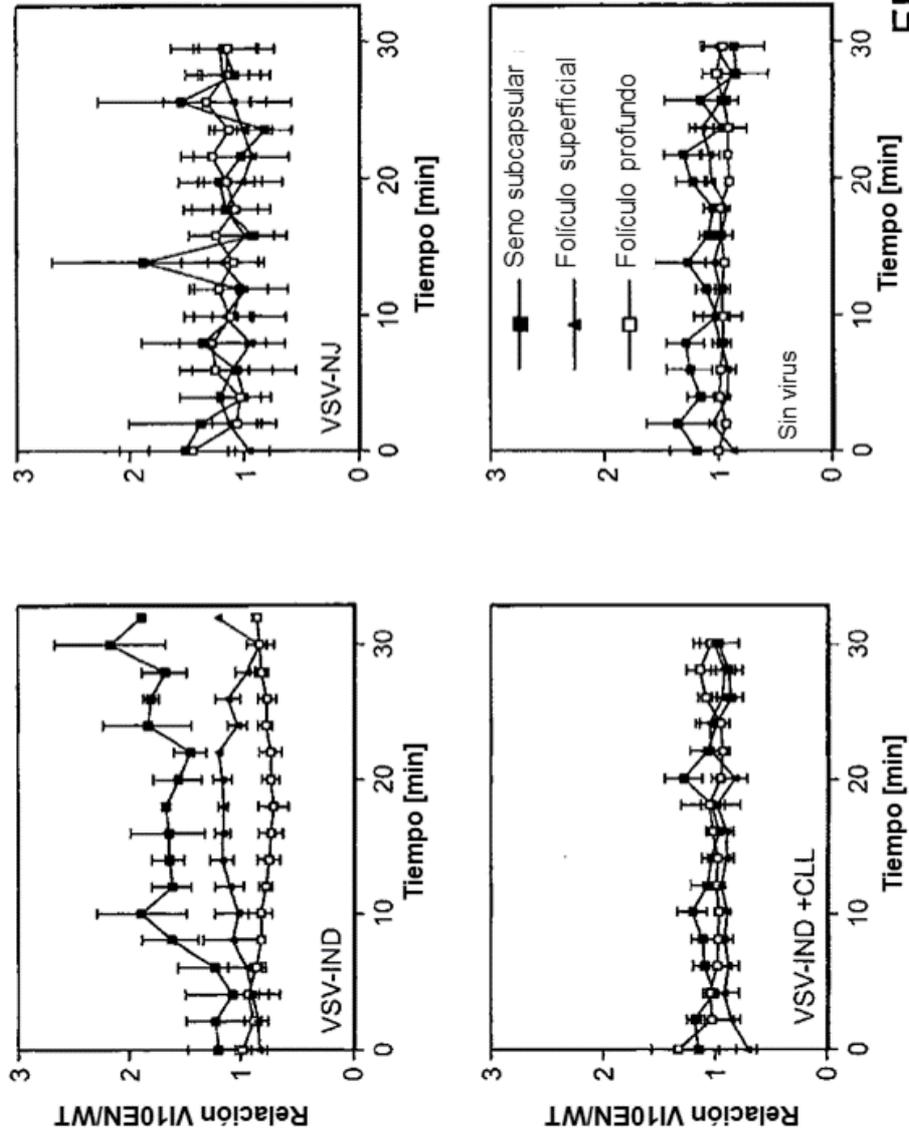


FIG. 17C

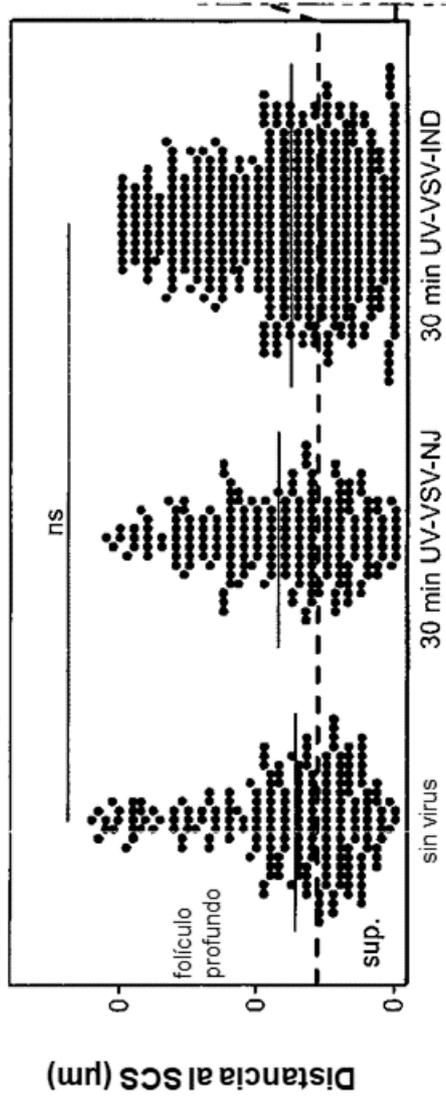


FIG. 17D

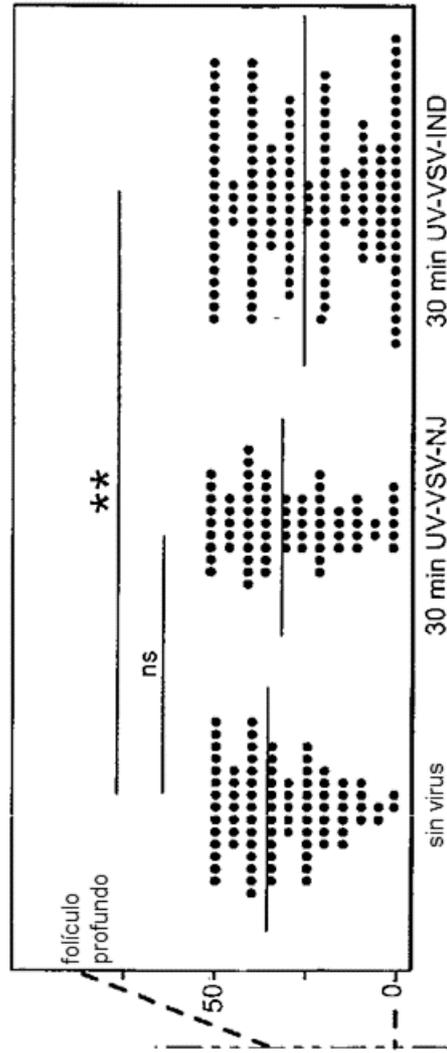


FIG. 17E

FIG. 18A

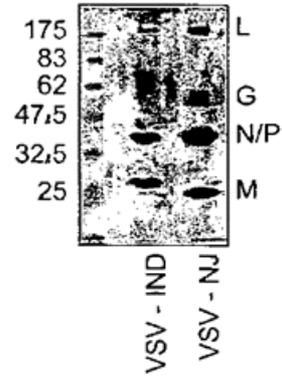
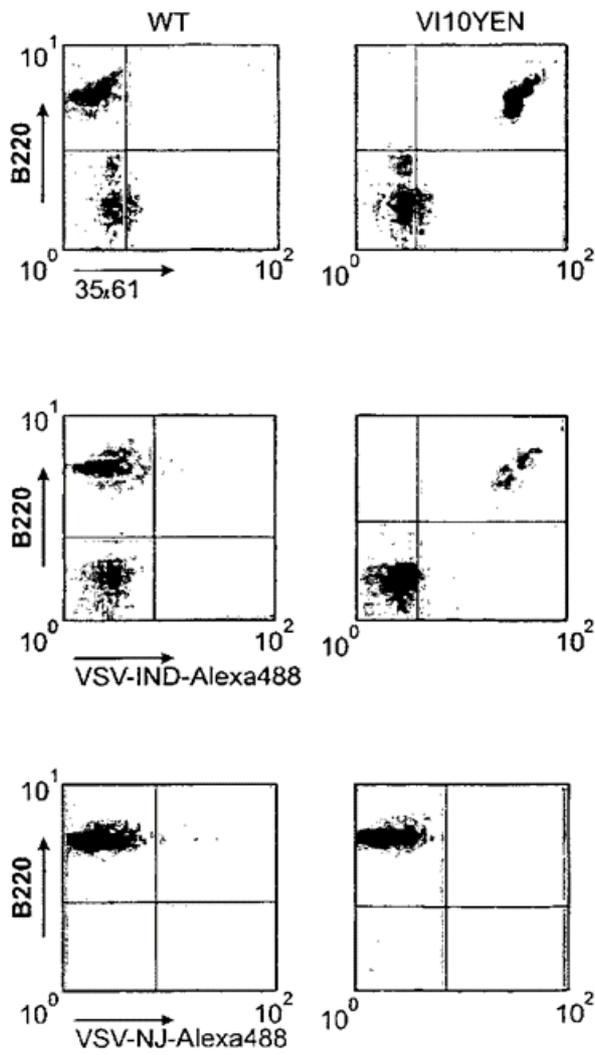


FIG. 18B



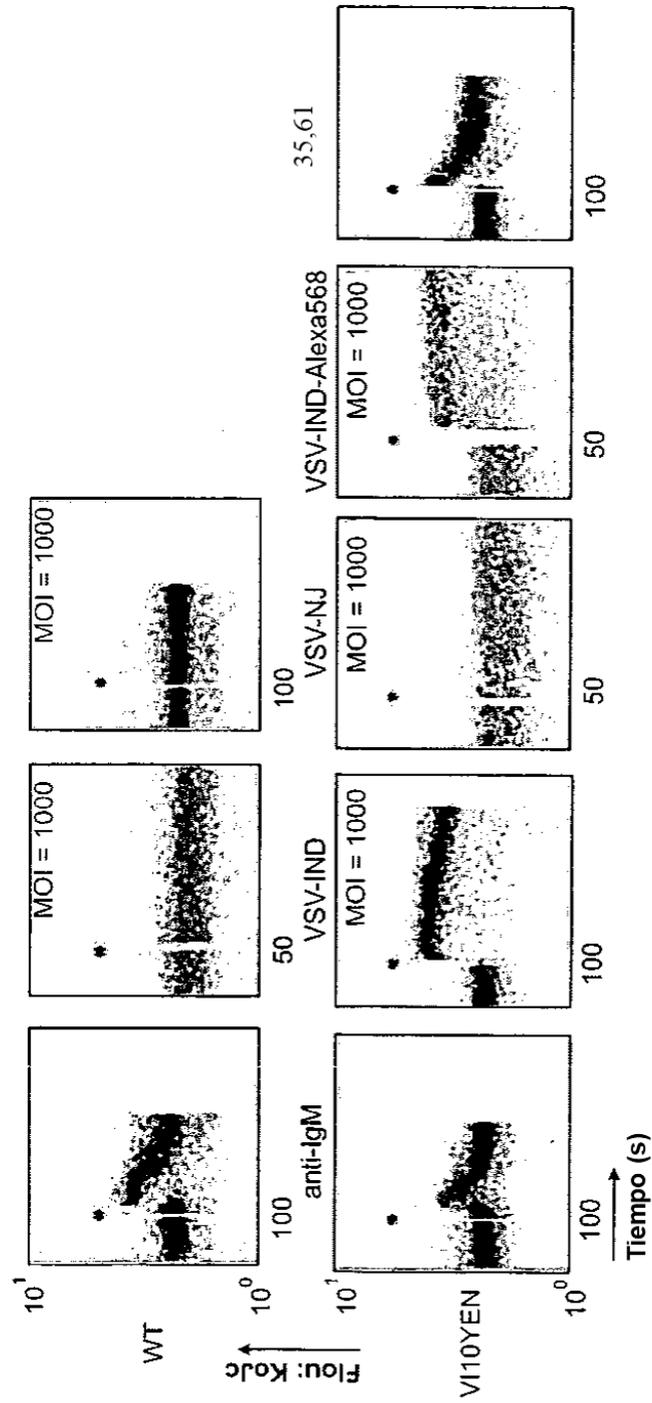


FIG. 18C

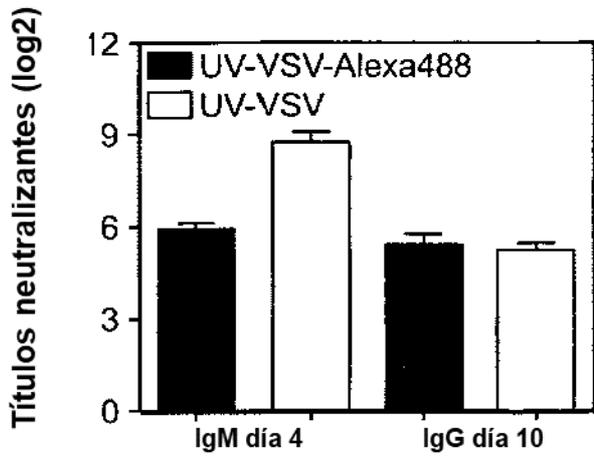


FIG. 18D

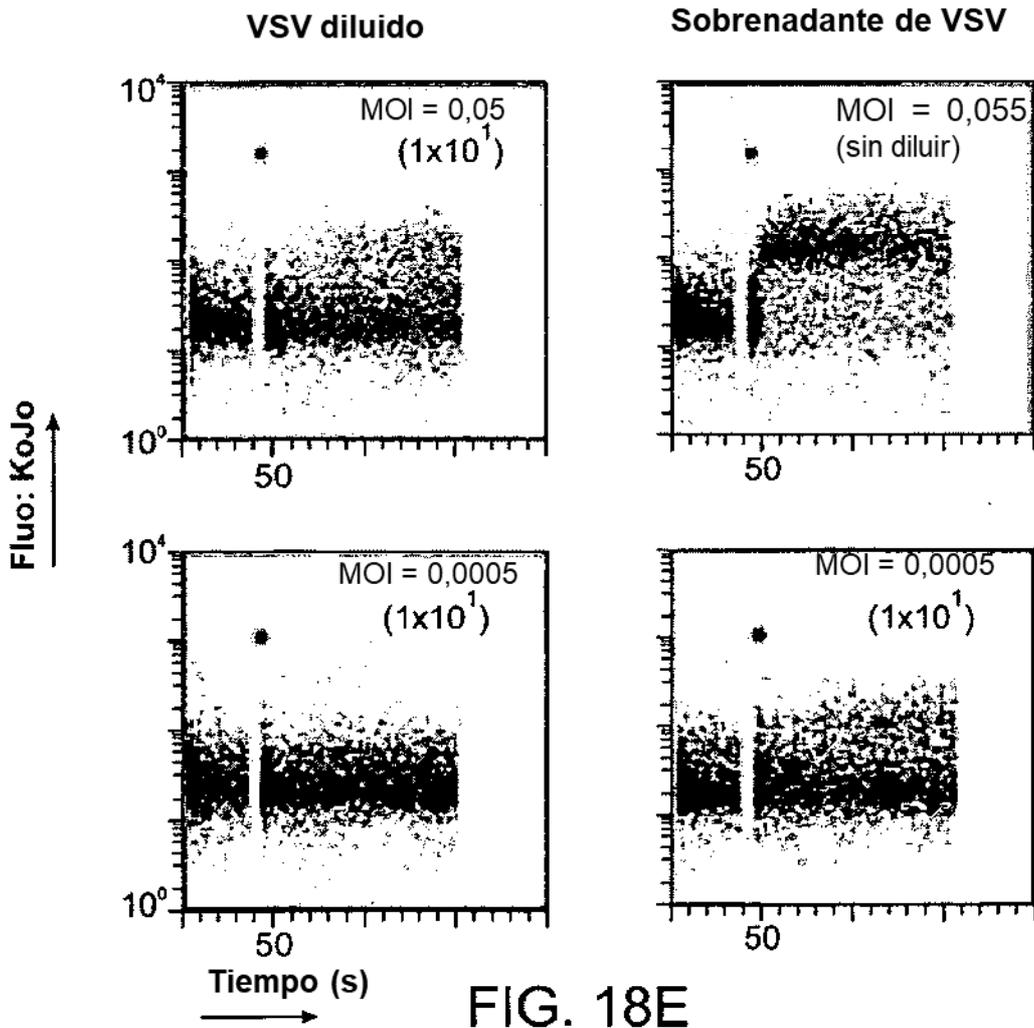


FIG. 18E

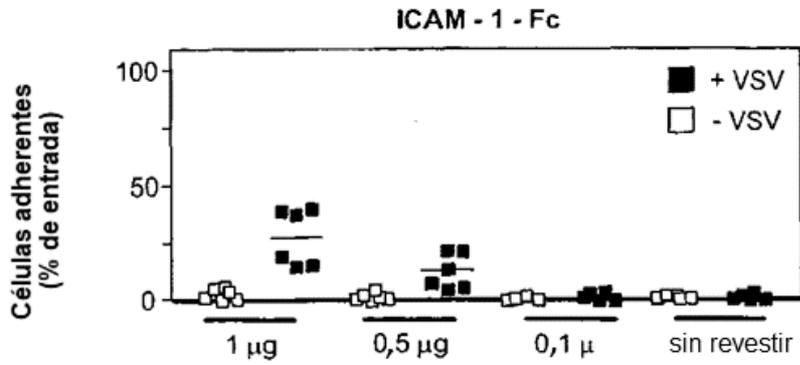


FIG. 19A

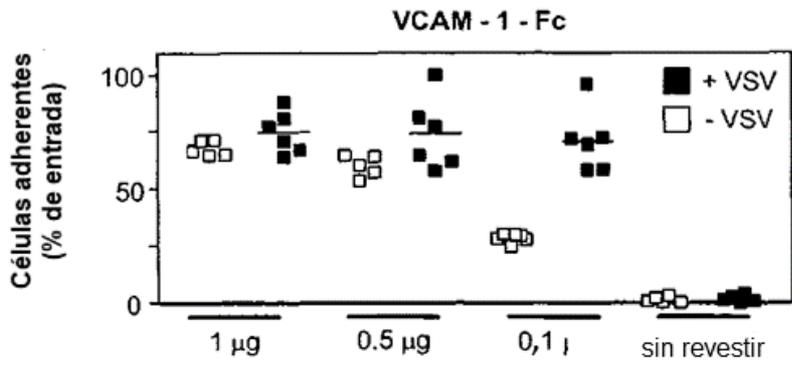


FIG. 19B

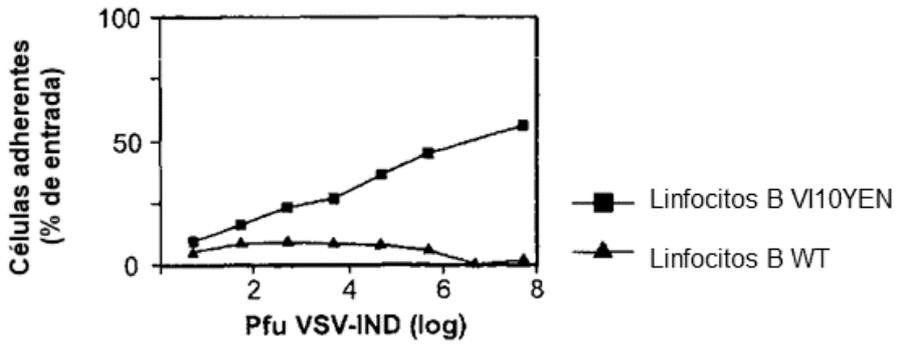


FIG. 19E

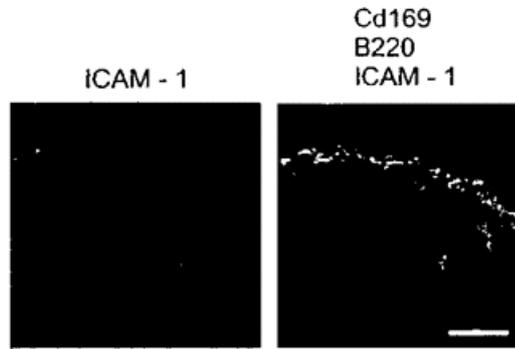


FIG. 19C

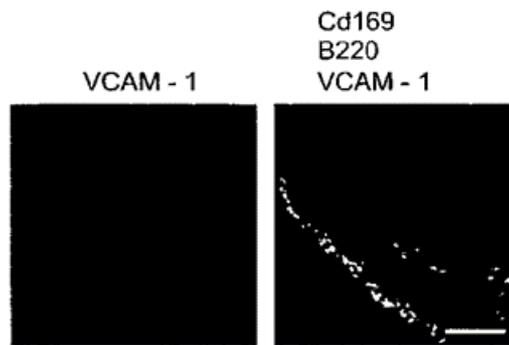


FIG. 19D

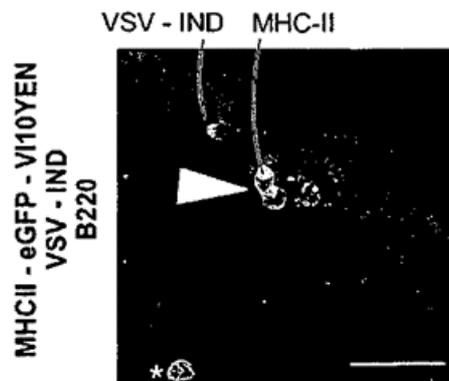


FIG. 20A

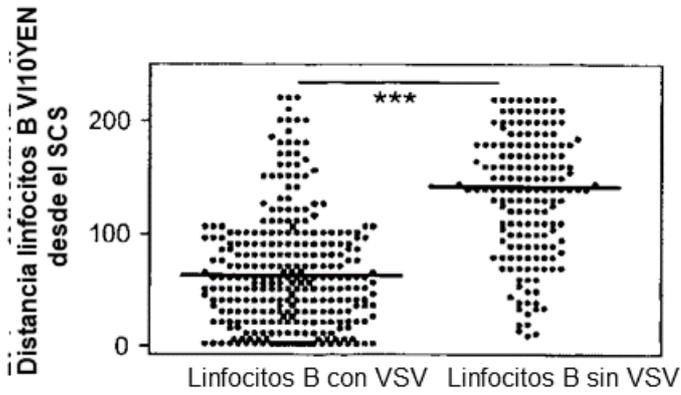


FIG. 20B

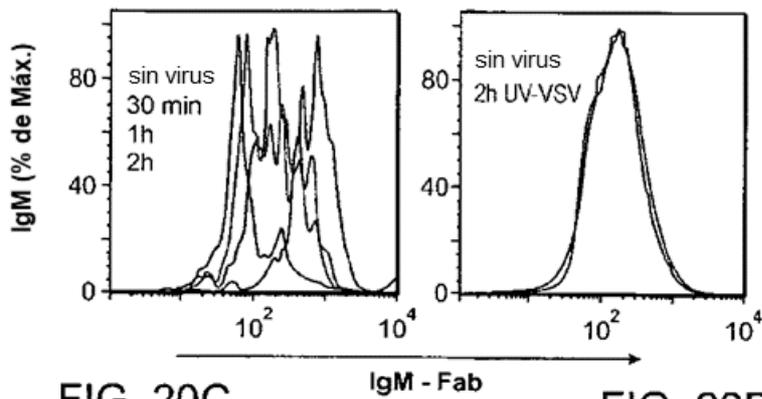


FIG. 20C

FIG. 20D

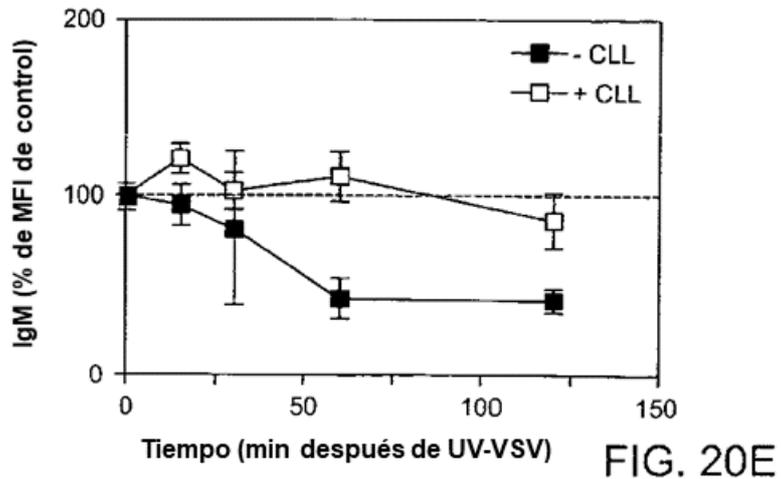


FIG. 20E

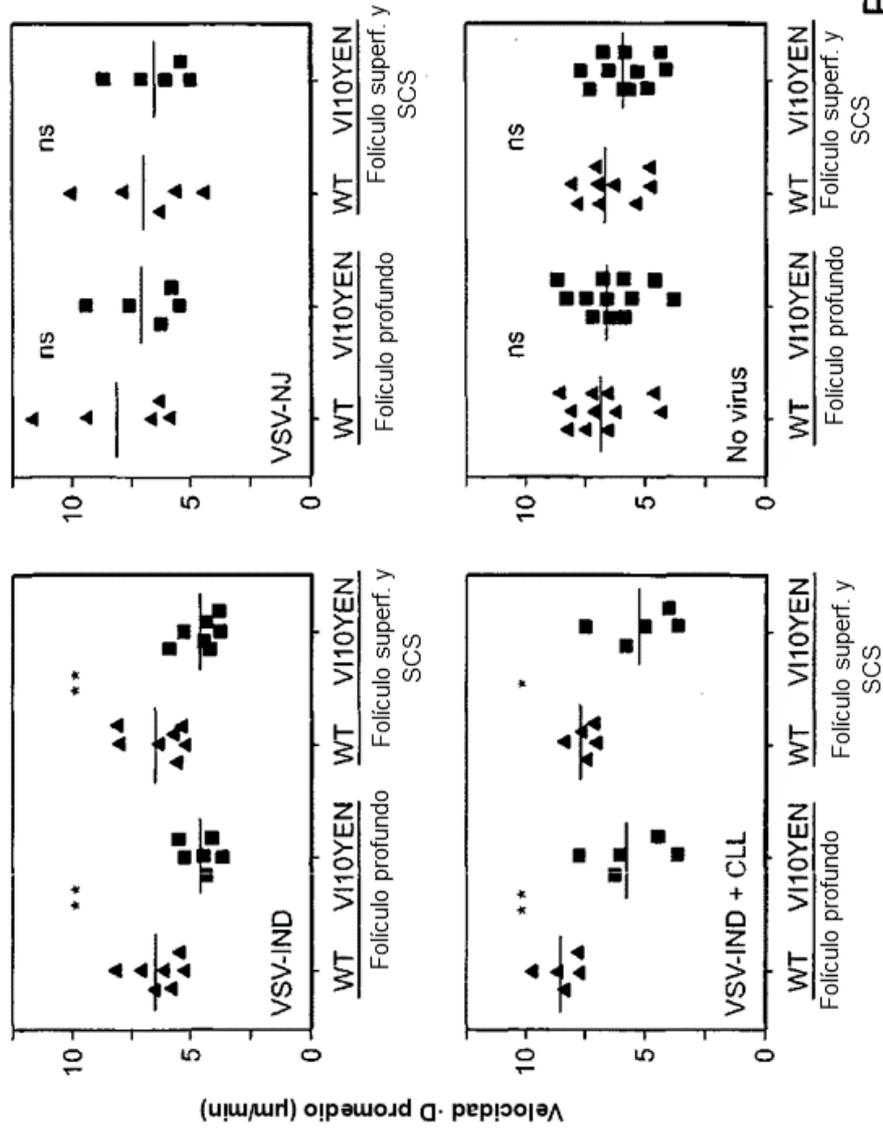
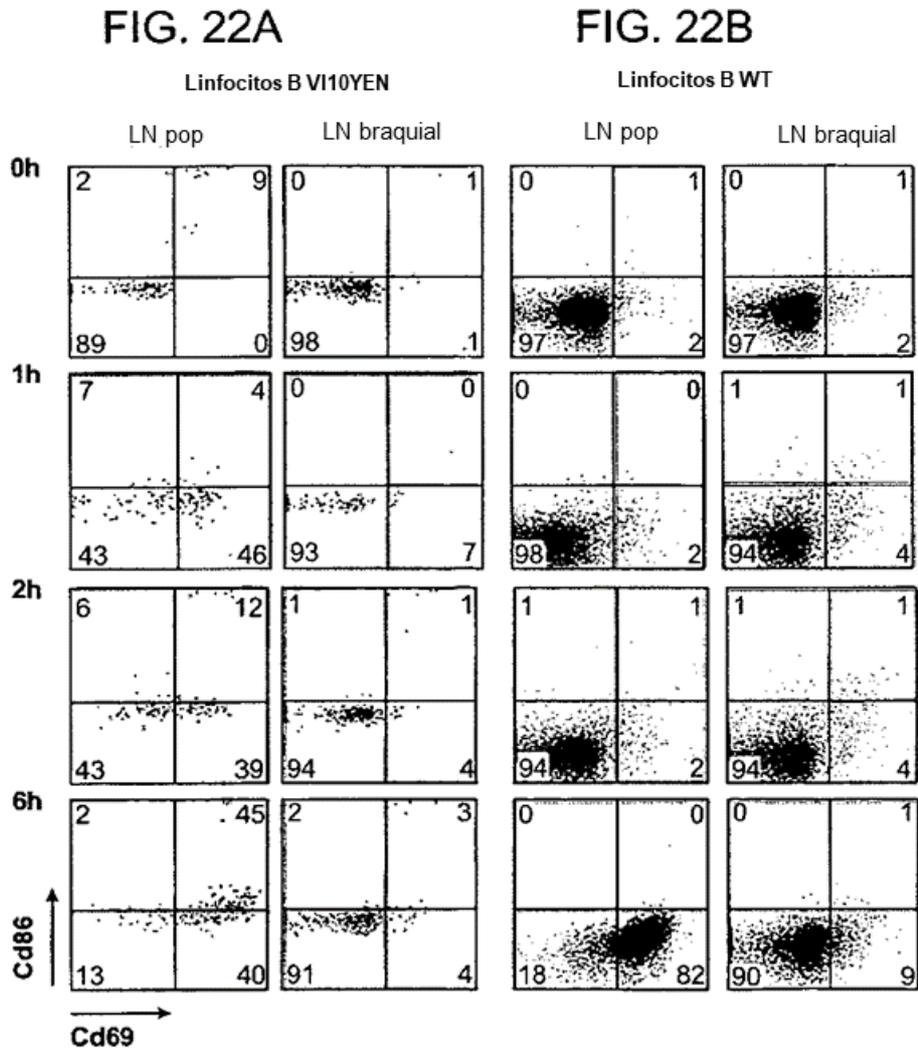


FIG. 21



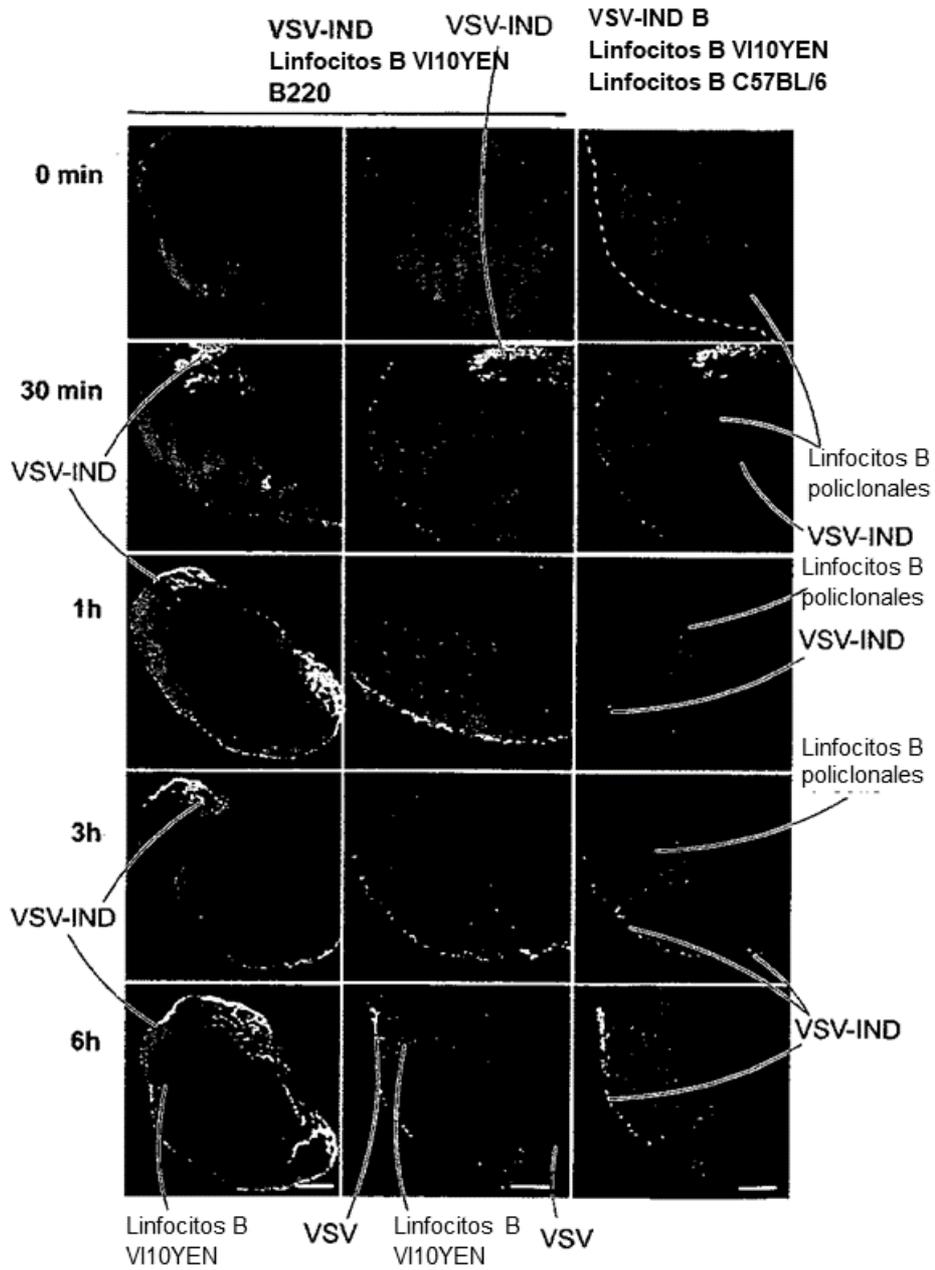


FIG. 23

Los NP dirigidos se acumulan sobre SCS-Mph

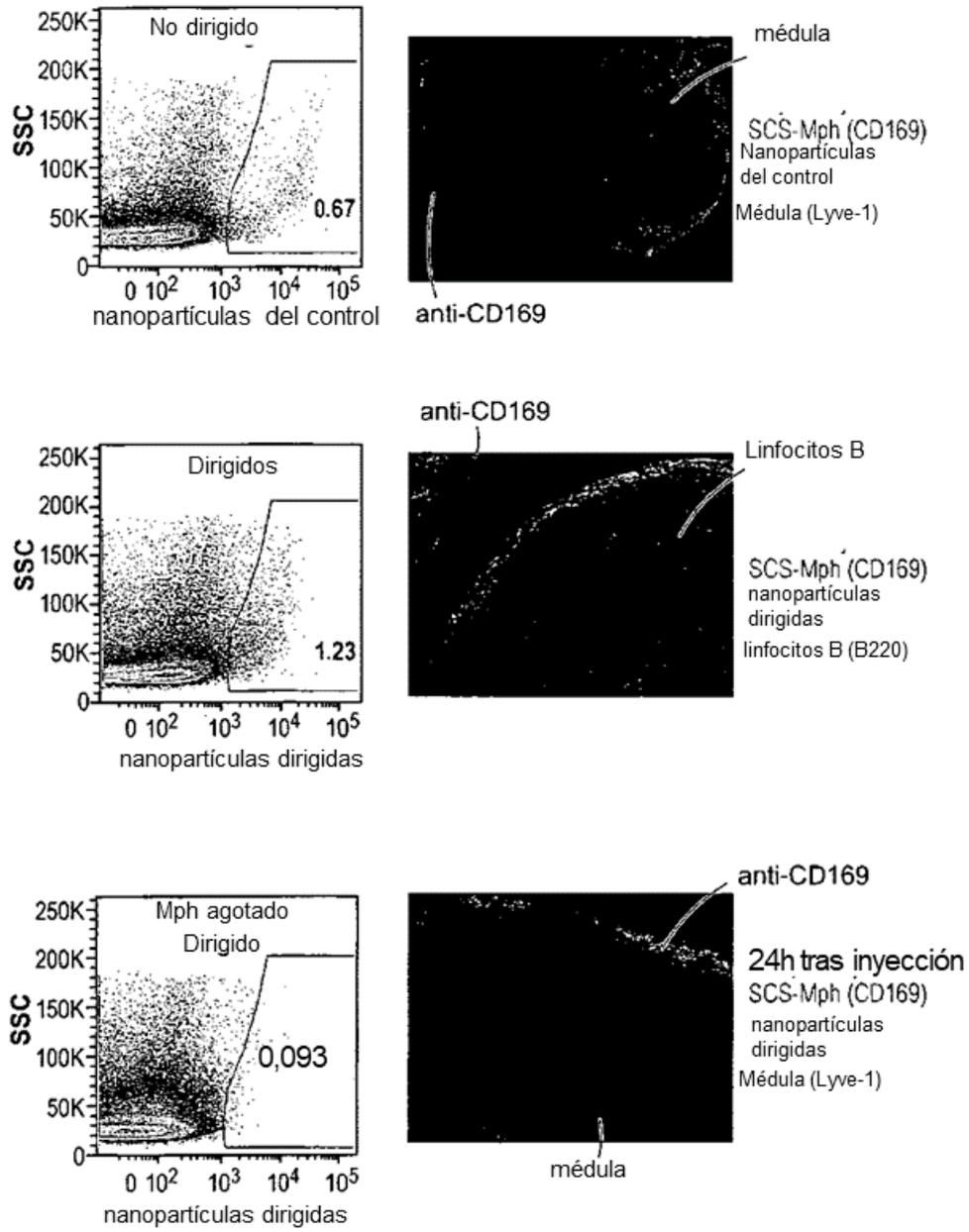
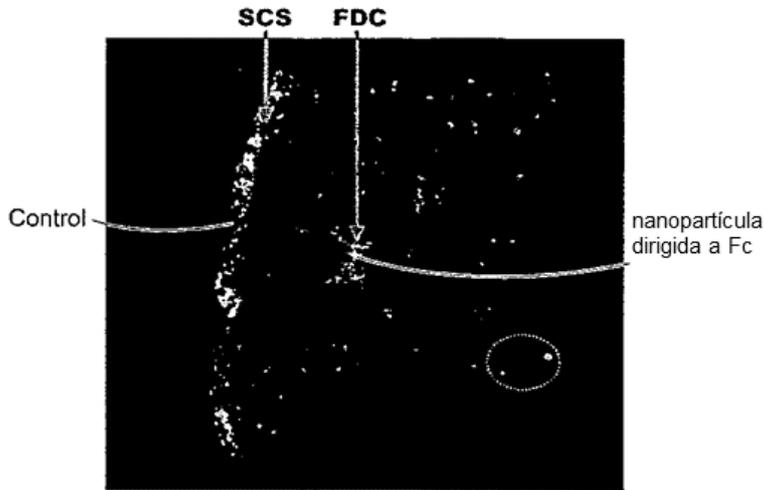


FIG. 24A

Fc-NP se dirige a los SCS-Mph y a las células dendríticas foliculares



24h después de la inyección

NPS dirigidas a Fc; NPS del control; linfocitos B FIG. 24B

Estrategia alternativa de direccionamiento de SCS-MPh: CX3CR1 expresado en macrófagos

LN de ratón
doblemente
inactivado
CX3CR (SCS-Mph)
CCR2 (médula/corteza)

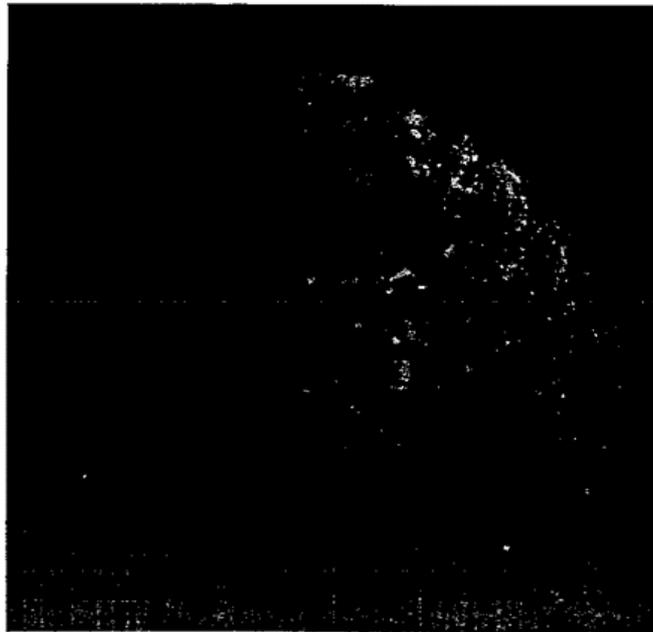


FIG. 25

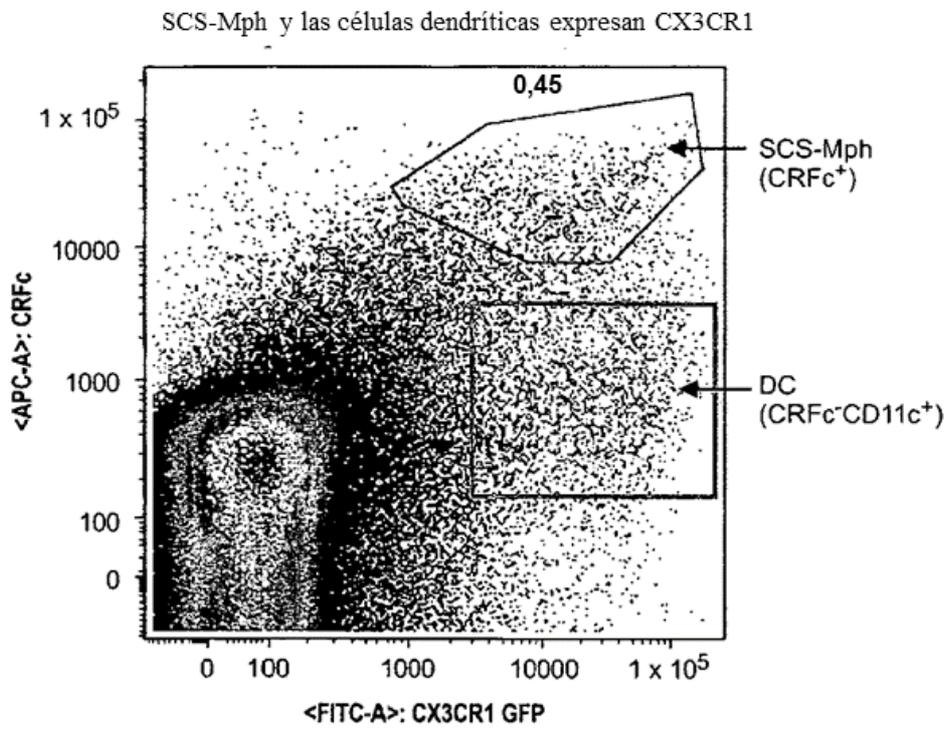


FIG. 26

Las nanopartículas de látex modificado con amina se acumulan sobre SCS-Mph

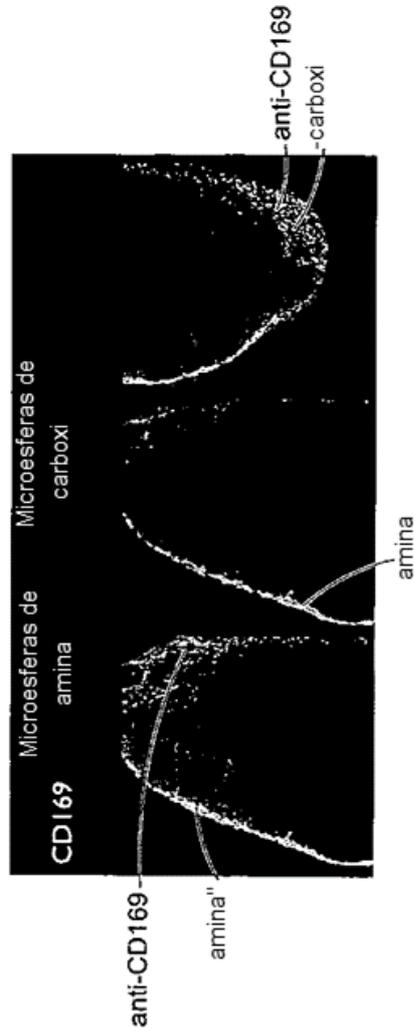


FIG. 27

Las nanopartículas dirigidas que transportan aminas son muy inmunógenas

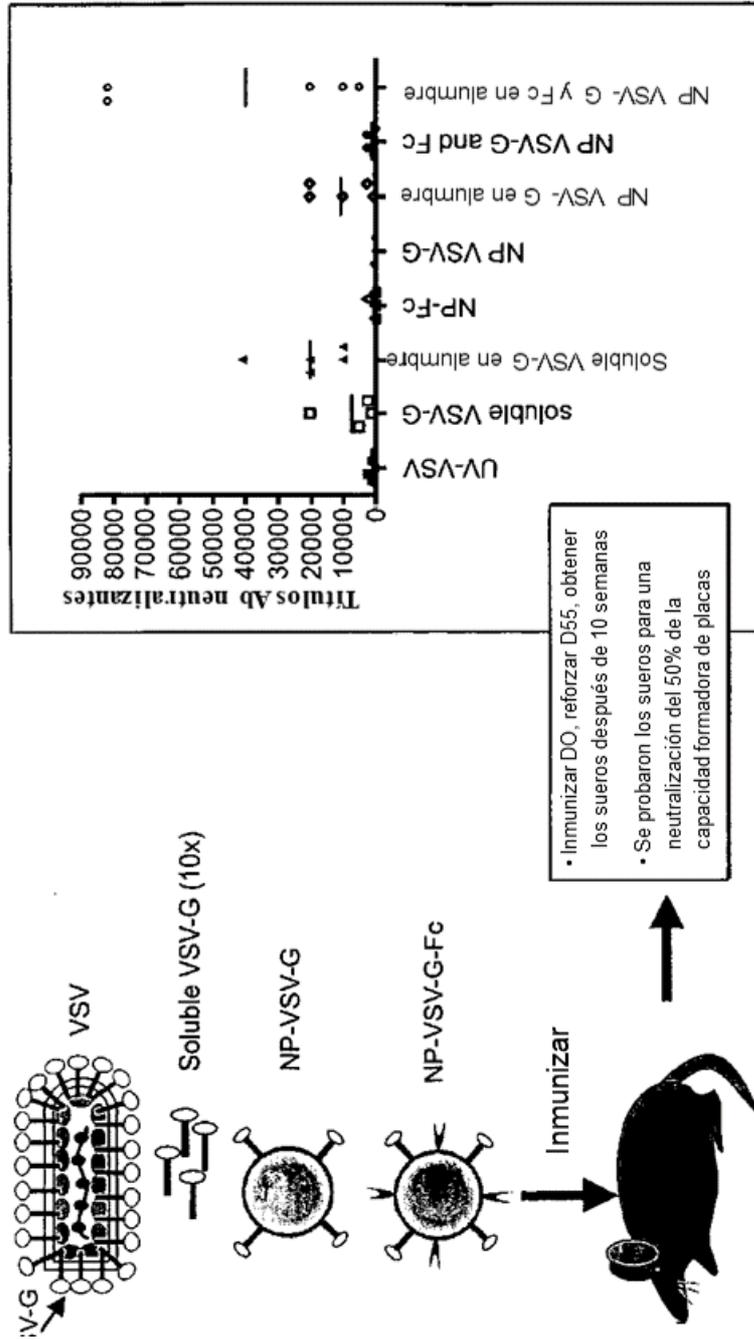


FIG. 28A

La vacunación con nanopartículas dirigidas que transportan antígenos protege contra la infección letal con VSV

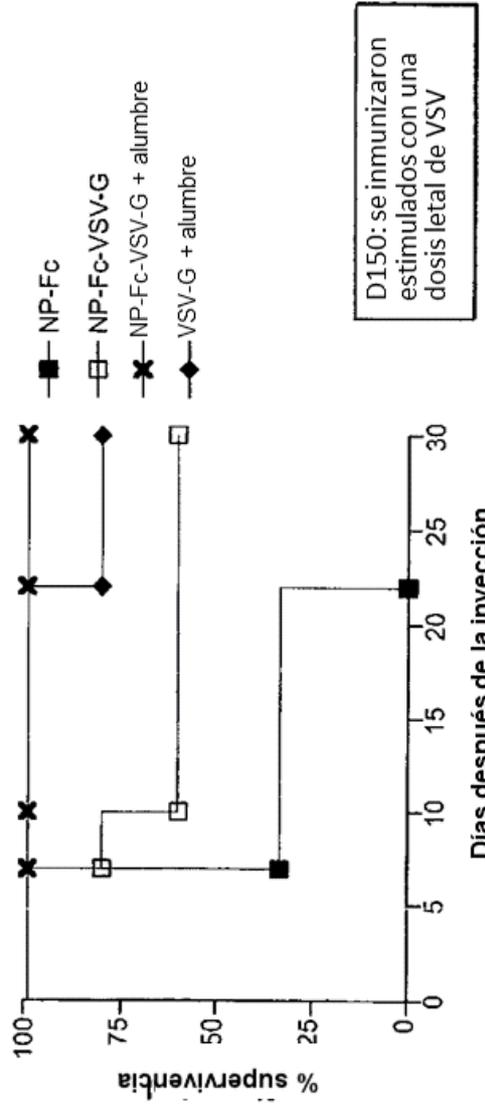


FIG. 28B

Respuesta de los linfocitos T CD4 a OVA-NP mezclado con adyuvante de CpG (agonista de TLR9)

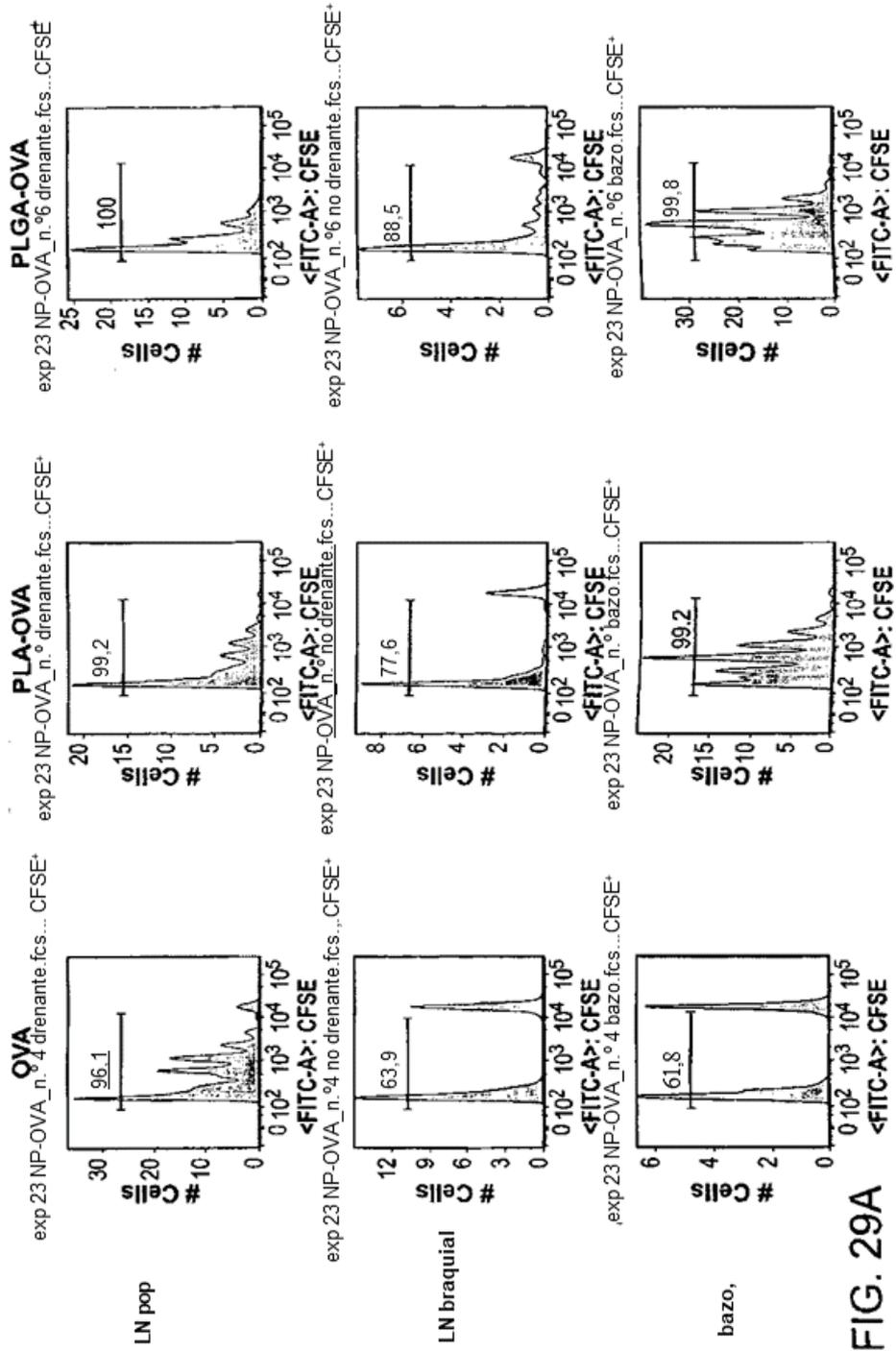
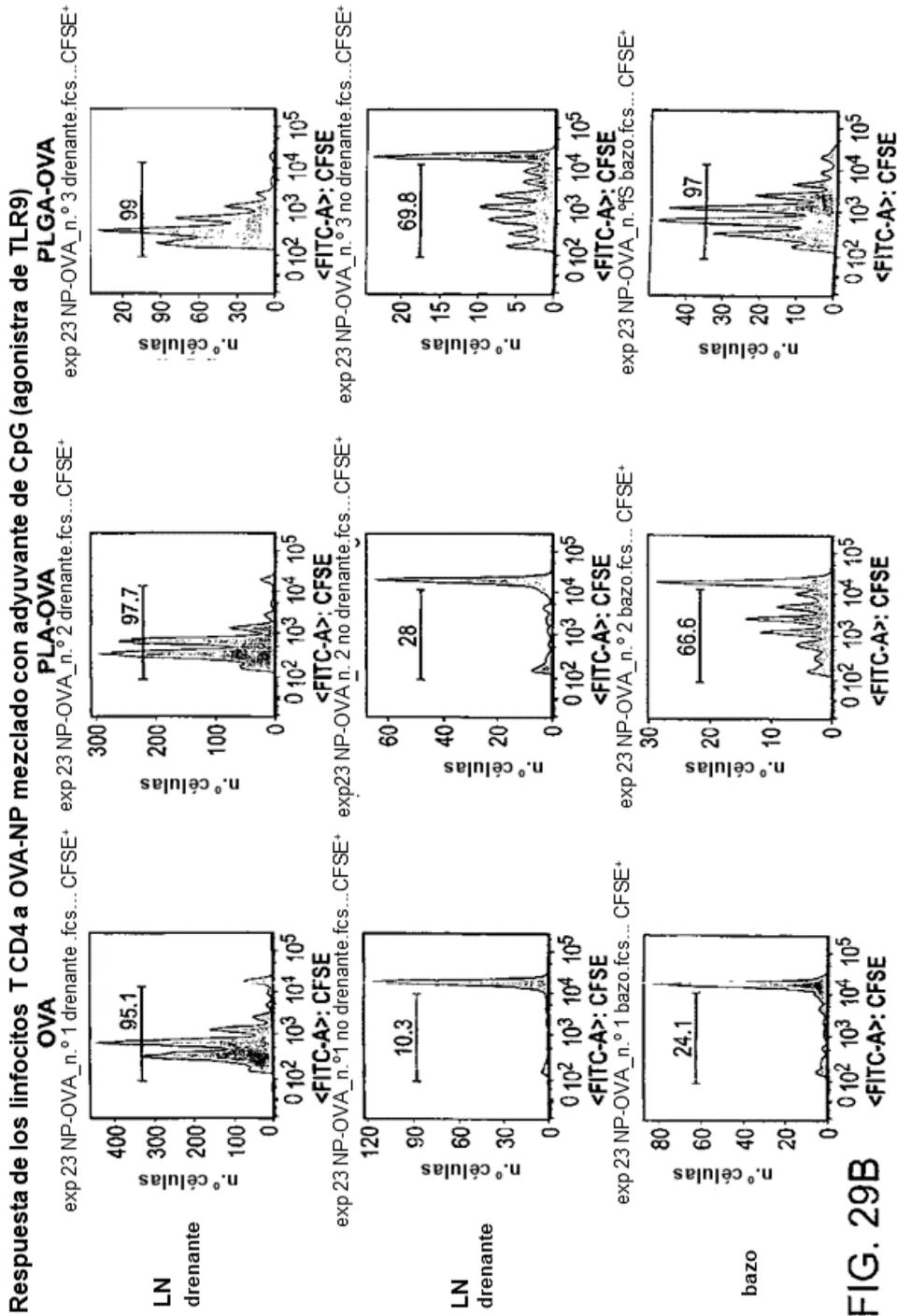


FIG. 29A



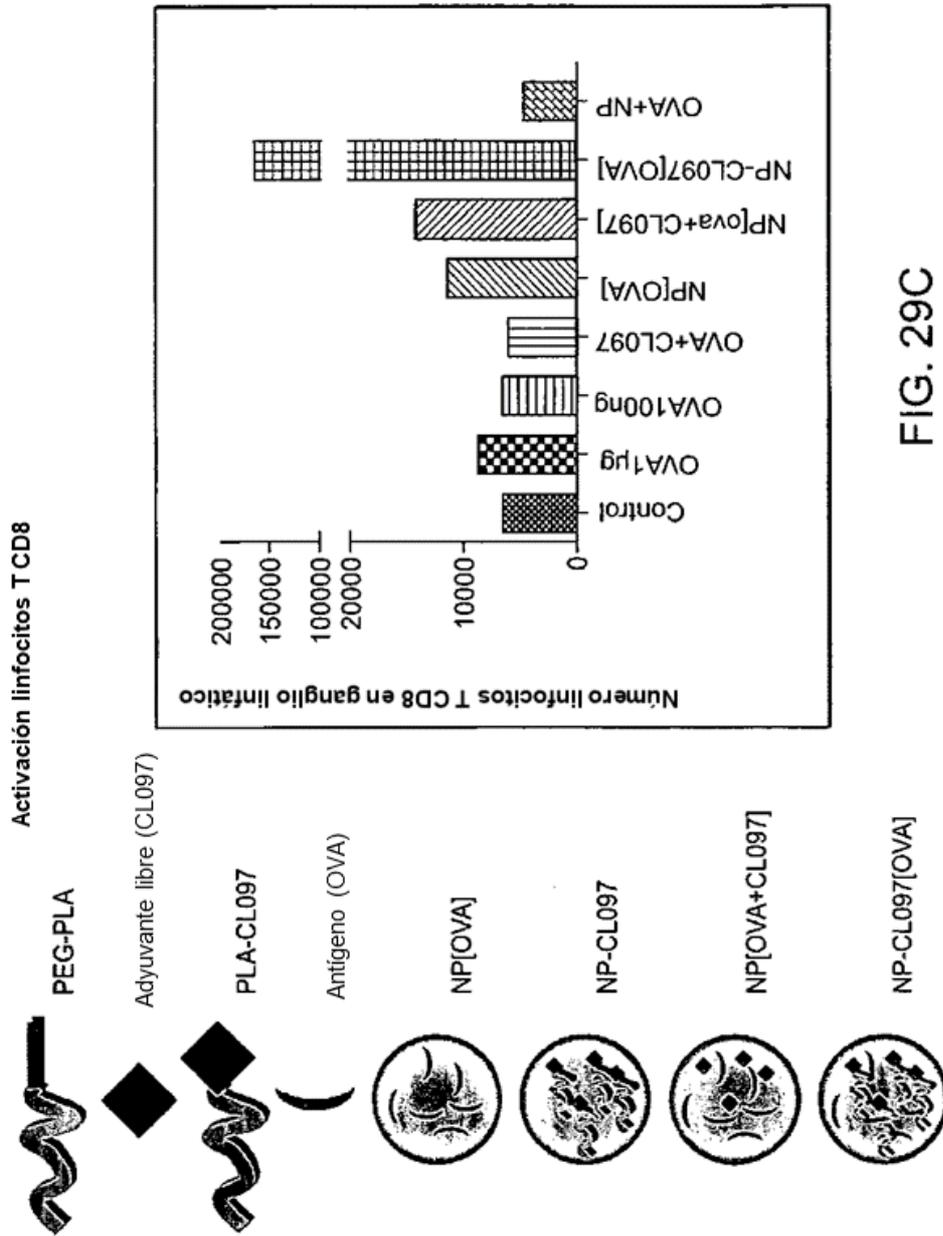


FIG. 29C

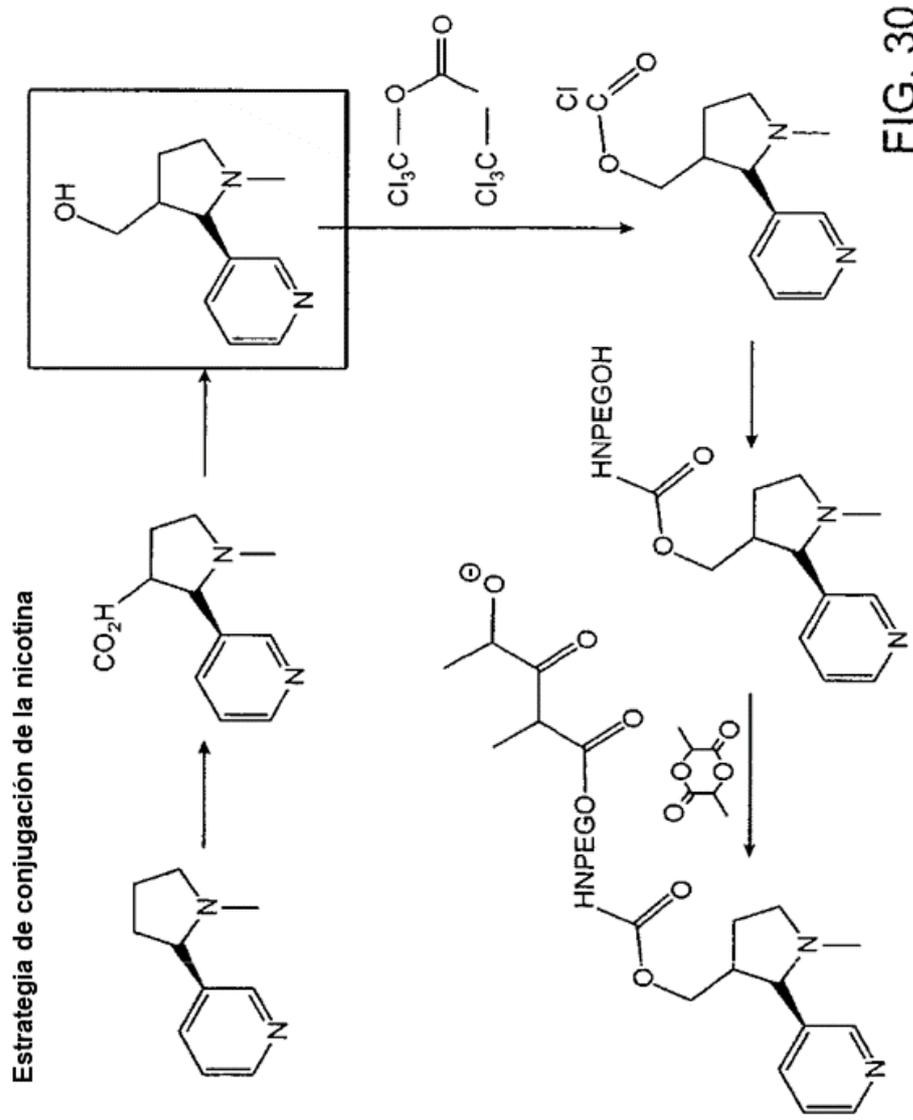


FIG. 30

