

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 022**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)
A61K 49/18 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 51/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2012 PCT/EP2012/004735**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13072051**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2012 E 12790425 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017 EP 2780036**

54 Título: **Composiciones de nanopartículas para la generación de linfocitos T reguladores y tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y otras afecciones inflamatorias crónicas**

30 Prioridad:

14.11.2011 EP 11009032

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.08.2017

73 Titular/es:

**TOPAS THERAPEUTICS GMBH (100.0%)
Falkenried 88, Haus B
20251 Hamburg, DE**

72 Inventor/es:

**FREUND, BARBARA;
HEEREN, JÖRG;
NIELSEN, PETER;
CARAMBIA, ANTONELLA;
HERKEL, JOHANNES;
BRUNS, OLIVER;
LOHSE, ANSGAR;
LÜTH, STEFAN;
WELLER, HORST y
SALMEN, SUNHILD**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 630 022 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de nanopartículas para la generación de linfocitos T reguladores y tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y otras afecciones inflamatorias crónicas

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden nanopartículas para su uso en la administración dirigida de un antígeno a células hepáticas, en particular, células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC) y/o células de Kupffer y para la generación *in vivo* de linfocitos T reguladores, especialmente linfocitos T reguladores (Treg) CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. La invención proporciona composiciones para su uso en la prevención y tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, alergias u otras afecciones inflamatorias crónicas, y para la generación de linfocitos T reguladores.

La tolerancia inmunitaria a los autoanticuerpos se mantiene por múltiples mecanismos que controlan los linfocitos autorreactivos potencialmente patógenos, incluyendo la supresión, la anergia clonal o la supresión por los linfocitos T reguladores (1-3). La enfermedad autoinmunitaria, por lo tanto, puede ser el resultado de un control insuficiente de los linfocitos autorreactivos (4,5) y un objetivo principal de la inmunoterapia para las enfermedades autoinmunitarias es la inducción de la tolerancia a los autoantígenos restaurando la regulación (6). Una forma particularmente prometedora de restaurar la autotolerancia parece ser la manipulación de linfocitos T reguladores (Treg) CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ específicos de autoantígenos; la transferencia adoptiva de estas células puede prevenir afecciones autoinmunitarias o inflamatorias (6-10). De hecho, los Treg se asocian con varias moléculas secretadas o unidas a la membrana que comunican señales inhibitorias a otros linfocitos T efectores, con lo que se suprime la proliferación y secreción de citocinas inflamatorias (11,12). *In vivo*, la mayoría de los Treg parecen ser generados en el timo (8); sin embargo, estos linfocitos también pueden ser generados en la periferia (9, 10). De hecho, cada vez hay más datos que sugieren que los Treg periféricos pueden ser generados no solo por la expansión periférica de los Treg tímicos (13,14), sino también por la conversión *de novo* de linfocitos T CD4⁺Foxp3⁻ convencionales (15 - 18). Hasta ahora, sin embargo, no está claro cómo el potencial terapéutico de la generación de Treg específicos en la periferia podría traducirse efectivamente en terapias clínicamente aplicables.

El microambiente del hígado favorece la tolerancia inmunitaria, presumiblemente por una combinación de células presentadoras de antígeno tolerogénico y citocinas (19-22). Por lo tanto, en muchas situaciones, el resultado de la estimulación de los linfocitos T por las células del hígado es la tolerancia inmunitaria. Tal inducción de tolerancia hepática puede no solo funcionar localmente en el hígado, sino también sistémicamente. De hecho, se ha demostrado que los aloinjertos de hígado no solo están siendo bien aceptados, sino que, además, pueden facilitar la aceptación de injertos de piel del donante hepático; mientras que los injertos de piel de terceros, por el contrario, son rápidamente rechazados (23). La tolerancia oral, que es inducida por la administración oral del antígeno, parece ser al menos en parte facilitada por el hígado (24). Además, los inventores han demostrado previamente que la tolerancia hepática puede utilizarse para inducir los Treg específicos del neuroantígeno y la protección contra la enfermedad neuroinflamatoria autoinmunitaria (25), utilizando la transferencia génica a las células hepáticas. La generación de linfocitos Treg era independiente del timo, requirió la expresión ectópica del neuroantígeno en el hígado y se produjo por conversión de linfocitos T CD4⁺CD25⁻ convencionales (25, 34). Se sugirió que la administración de genes a los hepatocitos podría ser útil para el tratamiento de la enfermedad autoinmunitaria humana (25, 33). Las nanopartículas, incluidas las nanopartículas magnéticas, se han descrito en muchas publicaciones, incluyendo los documentos WO 2009/126835 A2; Gunn, J. et al., *Small*, 2008 June; 4(6): 712-715, EP 2 255 831; Sun, C. et al., *ACS Nano*. 27 de abril de 2010; 4(4): 2402-2410; EP 2 226 634 A2; US 2010/059550, Cho, YS. et al., *Cancer Lett.* 18 de diciembre de 2010; 299(1):63-71; Garden, OA et al., *J Immunol Methods*. 2006 Jul 31; 314(1-2):123-33 y US 2011/054255. Estas partículas se utilizaron principalmente para el marcado y el estudio de imagen de las células, así como para la inmunoterapia del cáncer.

Otro documento pertinente de la técnica anterior es WO 2009/067349, que divulga una composición farmacéutica que comprende una nanopartícula biocompatible unida a un ligando del factor de transcripción del receptor de hidrocarburos arilo (AHR) para su uso en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios aumentando el número y/o actividad de linfocitos T reguladores (Treg). A la luz del estado de la técnica, los inventores resolvieron el problema de proporcionar una composición farmacéutica capaz de inducir linfocitos T reguladores y, por tanto, útil para tratar y prevenir una enfermedad en la que la supresión de una respuesta inmunitaria específica es beneficiosa, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria, una alergia o una enfermedad en la que la inflamación es excesiva, crónica o adversa, en la que dicha composición farmacéutica es adecuada para su uso en sujetos humanos y evita, por ejemplo, problemas potencialmente asociados con la transferencia génica.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la generación de linfocitos T reguladores específicos de al menos un epítipo de linfocito T en un sujeto para tratar o prevenir una enfermedad en la que la supresión de una respuesta inmunitaria específica es beneficiosa, en la que la composición comprende una nanopartícula, comprendiendo dicha nanopartícula

a) una micela que comprende un polímero anfifílico que hace que la nanopartícula sea soluble en agua, y

b) un péptido que comprende el al menos un epítipo de linfocito T asociado con el exterior de la micela.

En el contexto de la invención, el término “nanopartícula” se utiliza indistintamente con “partículas nanométricas”. Tales partículas tienen un diámetro de 1-999 nm, preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 600 nm, aproximadamente 5 a aproximadamente 500 nm, aproximadamente 10 a aproximadamente 300 nm, aproximadamente 30 a aproximadamente 100 nm, aproximadamente 40 a aproximadamente 50 nm.

Los inventores han observado que, después de la administración *in vivo* a un sujeto de las composiciones que comprenden nanopartículas específicas asociadas con un péptido como se ha descrito anteriormente, estas nanopartículas se localizan en el hígado, en particular, en células endoteliales sinusoidales hepáticas y son capaces de inducir linfocitos T reguladores específicos del péptido asociado. Los linfocitos T reguladores inducidos eran capaces de suprimir la encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE) en un modelo animal.

Anteriormente, se había observado que las nanopartículas se localizaban en una variedad de tejidos, incluyendo células hepáticas (35-38) y también se había observado que tenían una diversa variedad de efectos sobre el sistema inmunitario (36-38). La localización predominante de las nanopartículas actualmente administradas en células endoteliales sinusoidales hepáticas y la clara inducción de linfocitos T reguladores por las nanopartículas de la invención fue por tanto sorprendente.

Las nanopartículas utilizadas en la invención comprenden una micela que comprende un polímero anfifílico que hace que la nanopartícula sea soluble en agua. En el contexto de la presente invención, el término “micela” se refiere a un agregado de moléculas anfifílicas dispersadas en una solución acuosa. Las partes hidrófilas de las moléculas anfifílicas están en contacto con el disolvente circundante, secuestrando las regiones de “cola” hidrófobas de las moléculas anfifílicas en el interior de la micela, haciendo de este modo que la nanopartícula sea soluble en agua. Este tipo de micela también se conoce como una micela de fase normal (o micela de aceite en agua). En el contexto de la invención, la micela está formada por una sola capa de un polímero anfifílico. Está claro para el experto que tal micela es estructuralmente distinta de una bicapa o un liposoma formado por un polímero anfifílico. Tales estructuras no están, o no están en un porcentaje significativo (por ejemplo no más del 10 %, más del 5 %, o preferiblemente más del 1 %), comprendidas en la composición farmacéutica.

En una realización preferida, el polímero anfifílico que forma la micela es un polímero sintético. Puede comprender una región hidrófoba que comprende una “cola” hidrófoba, por ejemplo, una “cola” carboxílica que tiene una longitud de aproximadamente 14 - 22, preferiblemente, 16 - 18 átomos de carbono. La región hidrófila del polímero puede cargarse negativamente en una solución acuosa. La masa molecular del polímero puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 30.000-50.000 g/mol. Preferiblemente, el polímero es un copolímero maleico, tal como poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (disponible, por ejemplo, de Sigma Aldrich). El polímero también puede ser, por ejemplo, poli(anhídrido maleico-alt-1-tetradeceno) o copolímero de bloques de poli(óxido de etileno) bloques de poliisopreno (PI-b-PEO). La micela puede estar formada por una, pero también por más de una, por ejemplo, dos, tres o cuatro moléculas poliméricas anfifílicas. En general, en el contexto de la memoria descriptiva, “uno” o “una”, “el” o “la” no pretende limitarse a “uno” a menos que se divulgue específicamente.

En una realización de la invención, el núcleo de la micela no comprende moléculas ni compuestos adicionales, sino que consiste en las regiones hidrófobas de los polímeros anfifílicos (tal micela se muestra esquemáticamente en la Figura 3A).

En otra realización, la micela recubre un núcleo hidrófobo sólido (como se muestra esquemáticamente en la Figura 3B), el cual preferiblemente es un núcleo inorgánico. Preferiblemente, el núcleo inorgánico es un núcleo inorgánico rastreado, por ejemplo, que comprende óxido de hierro, CdSe, plata u oro. El diámetro del núcleo es de aproximadamente 2 a aproximadamente 500 nm, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 nm, más preferiblemente de aproximadamente 9 a aproximadamente 12 nm.

Ejemplos de núcleos inorgánicos son nanopartículas de FeO estabilizadas por ácido oleico u otro ácido carboxílico (C14-C22, preferiblemente, C16-18), puntos cuánticos (CdSe/CdS/ZnS estabilizado, por ejemplo, por trioctiloxinfosfinóxido), nanopartículas de oro estabilizadas por compuestos sulfónicos. Tales núcleos inorgánicos por sí mismos son generalmente no estables en un disolvente acuoso tal como agua, pero incrustándolos en las micelas poliméricas se convierten en solubles en agua. Las partes hidrófobas del polímero anfifílico interactúan con el núcleo hidrófobo de la nanopartícula, dando lugar a la formación de una única capa de revestimiento de polímero que rodea al núcleo.

Preferiblemente, los núcleos hacen que las nanopartículas para su uso en la invención sean trazables, por ejemplo, por sus características en fluorescencia, microscopía electrónica u otro método de detección.

En una realización preferida de la invención, la nanopartícula comprende un núcleo de óxido de hierro que tiene un diámetro de aproximadamente 9 a aproximadamente 12 nm encapsulado por un revestimiento de poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) al que está unido un péptido que comprende un epitopo de linfocito T, preferiblemente, unido covalentemente. De acuerdo con una realización, las nanopartículas comprenden un núcleo de óxido de hierro lipófilo, sintetizado de acuerdo con un método de Colvin (26), preferiblemente con una modificación del tiempo de reacción para producir partículas de aproximadamente 9-12 nm como se describe en los ejemplos. De acuerdo con

una realización, las nanopartículas de óxido de hierro se encapsulan por incubación con una solución de poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) de acuerdo con un protocolo modificado a partir de (27) para producir partículas solubles en agua.

5 La nanopartícula, en virtud del polímero que forma la micela, puede cargarse negativamente o no tener carga, preferiblemente, está cargada negativamente. El recubrimiento polimérico puede comprender grupos ácido, por ejemplo, ácido carboxílico, dando lugar a una carga negativa.

10 El péptido se une preferiblemente covalentemente a las micelas, por ejemplo, por acoplamiento de carbodiimida o succinimida, por ejemplo, conjugación vía 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (como, por ejemplo, en el ejemplo 4 siguiente), o por otro método de acoplamiento covalente de péptidos. El péptido está localizado en el exterior de las micelas. El péptido también puede estar asociado no covalentemente a la nanopartícula. Tales nanopartículas pueden prepararse, por ejemplo, por inmersión y secado como se describe por Giri et al. (36).

15 El término "péptido" no está destinado a limitar su tamaño, en particular, el péptido puede comprender una proteína completa o de aproximadamente 8 a aproximadamente 2.000 aminoácidos, preferiblemente 8-200 aminoácidos, 8-100 aminoácidos, 9-60 aminoácidos o 10-20 aminoácidos. El término también comprende combinaciones de diferentes péptidos, que pueden estar unidos entre sí como polipéptidos de fusión. El péptido comprende al menos un epítipo de linfocito T contra el que se han de generar linfocitos T reguladores. Al menos un epítipo necesita ser capaz de ser presentado por las células del sujeto al que se van a administrar las nanopartículas, es decir, el péptido y/o el sujeto necesitan ser seleccionados apropiadamente. Preferiblemente, el péptido comprende varios epítipos que permiten presentarlo en una pluralidad de tipos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

20 Como los linfocitos T reguladores son predominantemente CD4⁺, la presentación en MHC de clase II es de interés principal a este respecto. El fenotipo de un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, se puede probar fácilmente. Los epítipos de un péptido específico que se pueden presentar en moléculas específicas de MHC son conocidos y/o pueden seleccionarse rutinariamente, por ejemplo, mediante un software apropiado. Preferiblemente, el péptido comprende un número y una selección suficiente de epítipos para permitir que se presente en al menos el 20 %, preferiblemente al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de una población de sujetos, en el que, población de sujetos puede ser la población general o, preferiblemente, una población de sujetos que tienen una cierta enfermedad, afección, trastorno asociado con el péptido como se describe abajo. Preferiblemente, el sujeto es humano, pero también puede ser ratón, rata, conejo, cobaya, cerdo, mono, vaca, oveja, cabra, gato o perro.

35 El péptido puede sintetizarse, expresarse de forma recombinante o aislarse o modificarse a partir de fuentes naturales. Preferiblemente, el péptido, o al menos el epítipo contra el que se generan los linfocitos T reguladores, se deriva de un péptido/proteína contra el cual se debe suprimir una respuesta inmunitaria inflamatoria, por ejemplo, en el contexto del tratamiento o prevención de una enfermedad autoinmunitaria o una alergia. El péptido puede, por ejemplo, ser un alérgeno, un antígeno autoinmunitario conocido, o un fragmento o derivado del mismo. El péptido puede combinar varios epítipos de diversos antígenos.

40 Los inventores han observado que las nanopartículas para su uso en la presente invención son adecuadas para transferir el péptido a células endoteliales sinusoidales hepáticas de un sujeto *in vivo*. Como se ha descrito ante, también existen otras células diana, sin embargo, sin pretender estar ligado a la teoría, el direccionamiento a células endoteliales sinusoidales hepáticas parece ser importante para la generación de linfocitos T reguladores, ya que la composición farmacéutica induce la generación de linfocitos T reguladores específicos para el al menos un epítipo a través de la presentación de dicho epítipo por células endoteliales sinusoidales hepáticas. Preferiblemente, al menos el 60 % de las nanopartículas encontradas en el hígado después de la administración se localizan en células endoteliales sinusoidales hepáticas, más preferiblemente al menos 70 % o al menos 80 %. También puede encontrarse un porcentaje menor en las células de Kupffer o en las células endoteliales de las venas intestinales que alimentan la vena porta.

45 Las nanopartículas para su uso en la presente invención pueden seleccionarse por su capacidad para cargarse con péptido de carga y por su capacidad para dirigir dicho péptido de carga a células hepáticas, especialmente a las células endoteliales sinusoidales hepáticas.

50 Las nanopartículas pueden comprender un resto, por ejemplo, un hidrato de carbono o una proteína dirigida a ellas, o potenciar el direccionamiento a células específicas tales como células endoteliales sinusoidales de hígado y/o células de Kupffer. Tal resto podría, por ejemplo, aumentar o acelerar la captación de la circulación a través de la endocitosis mediada por receptor. Ejemplos de modificaciones adecuadas son hidratos de carbono tales como la manosa. Sin embargo, los inventores han mostrado que, ventajosamente, tales restos de direccionamiento adicionales no son necesarios en el contexto de la invención.

55 La composición farmacéutica para su uso en la invención puede comprender además al menos un excipiente y/o diluyente adecuado. El diluyente preferiblemente es agua o acuoso, por ejemplo, un tampón tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución de Ringer o solución de cloruro de sodio. Puede contener o no conservantes

adecuados. Es evidente que, en particular para la administración a un sujeto humano, la composición preferiblemente es estéril y biológicamente compatible.

La composición farmacéutica puede comprender además una citocina tal como TGF β .

Las nanopartículas están destinadas para su uso en y formuladas para administración a un sujeto que tiene una enfermedad en la que es beneficiosa la supresión de una respuesta inmunitaria específica.

La dosis y concentración requeridas para la administración al sujeto pueden ser determinadas por el médico responsable de acuerdo con los hechos y circunstancias del caso. Una dosis ilustrativa puede comprender de 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal, preferiblemente, aproximadamente 0,5-2 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, para un sujeto humano. La administración puede repetirse, por ejemplo, dos, tres o cuatro veces, por ejemplo, con, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 o 14 días entre las administraciones.

Preferiblemente, la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad en la que la supresión de una respuesta inmunitaria específica es beneficiosa, en la que dicha enfermedad se selecciona del grupo que comprende una enfermedad autoinmunitaria, una alergia o una enfermedad en la que la inflamación es excesiva, crónica o adversa. Tal enfermedad puede estar asociada con una inflamación excesiva o crónica. Las nanopartículas también pueden ser utilizadas en el tratamiento de afecciones clínicas asociadas con un resultado adverso de inflamación. Las enfermedades y afecciones inflamatorias que pueden tratarse por la composición farmacéutica para su uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple, diabetes tipo I, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, degeneración como consecuencia de un traumatismo o un ictus, enfermedad injerto contra hospedador, rechazo de un trasplante, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), asma, alergias, por ejemplo, rinitis alérgica, eczema alérgico y similares.

El término “tratar” tal como se usa en la presente memoria se refiere al alivio de los síntomas de una enfermedad particular en un sujeto y/o a la mejora de una medida determinable asociada con un trastorno particular.

Las composiciones para su uso en la invención se pueden administrar a un sujeto que necesite una composición farmacéutica que comprende una nanopartícula como se define en la presente memoria. Tal como se ha descrito, tales nanopartículas pueden cargarse con autoantígeno, aloantígeno u otro antígeno al que se dirige la respuesta inflamatoria adversa, o con péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos derivada o modificada a partir de dicho antígeno.

A pesar de que, desde hace tiempo, a menudo es posible generar respuestas inmunitarias protectoras, por ejemplo, inflamatorias en sujetos, por ejemplo humanos, para protegerlos, por ejemplo, contra enfermedades provocadas por patógenos, se ha buscado durante mucho tiempo un método para inhibir reacciones inmunitarias adversas de forma eficaz y específicamente en seres humanos, por ejemplo, en el contexto de enfermedades autoinmunitarias, inflamaciones crónicas y alergia. La presente invención proporciona por último composiciones farmacéuticas para su uso en la generación de células inmunitarias reguladoras específicas, que son, como se demuestra en un sistema modelo, incluso capaces de suprimir la enfermedad autoinmunitaria.

Leyendas de las figuras

Fig. 1: Generación eficiente de linfocitos Treg a partir de linfocitos T no reguladores CD4⁺CD25⁻ por varios tipos de células hepáticas, pero no por células dendríticas esplénicas.

Fig. 2: Mejoría y retraso en la aparición de la neuroinflamación autoinmunitaria experimental mediante la transferencia de linfocitos T específicos de neuroantígenos estimuladas por LSEC.

Fig. 3: Diseño esquemático de ejemplos de micelas para la administración dirigida de péptidos a células hepáticas. A: Una micela formada por un polímero anfifílico. Las partes hidrófobas del polímero forman el centro de la micela, mientras que las partes hidrófilas se vuelven hacia el exterior y hacen que la micela sea soluble en agua. En el ejemplo mostrado, las partes hidrófilas están cargadas negativamente. B: Una micela, formada como en A, recubre un núcleo sólido. El núcleo sólido puede ser, por ejemplo, un núcleo inorgánico tal como una nanopartícula de FeO estabilizada por moléculas de ácido oleico. Las partes hidrófobas del polímero interactúan con el núcleo hidrófobo, formando así una micela alrededor del núcleo.

Fig. 4A: Las nanopartículas fluorescentes para su uso en la invención se extraen rápida y específicamente de la circulación y se acumulan predominantemente en las células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC), como se demuestra mediante microscopía intravital. Además de las nanopartículas fluorescentes absorbidas en las LSEC que recubren los sinusoides hepáticos, los núcleos (redondos) se tiñen con DAPI.

Fig. 4B: Confirmación de la localización de nanopartículas para su uso en la invención en células endoteliales sinusoidales hepáticas mediante microscopía electrónica de transmisión.

Fig. 4C: Las nanopartículas incrustadas en liposomas de lipoproteínas ricas en triglicéridos recombinantes preparados de acuerdo con Bruns et al., 2009, se extraen específicamente de la circulación y se acumulan predominantemente en células de Kupffer, como se demuestra por microscopía intravital (a) en ratones tratados con control. (B) En ratones tratados con clodronato, en los que se agotaron las células de Kupffer, la captación de las nanopartículas liposómicas se reduce significativamente, confirmando la acumulación en células de Kupffer en ratones normales.

Fig. 5: La administración dirigida de péptido neuroantigénico a células hepáticas por conjugados péptido-nanopartícula, pero sin nanopartículas libres de péptidos, induce protección total contra la enfermedad neuroinflamatoria clínica.

Fig. 6: Conversión de Treg dependiente de TGF β por las células presentadoras de antígeno hepático. Se estimularon células no Treg CD4⁺Foxp3⁻ específicas de MBP con péptido MBP por DC, LSEC, KC hepáticas o DC esplénicas en presencia (A) o ausencia (B) de TGF β y se determinaron las tasas de conversión a Treg Foxp3⁺. C) Conversión a Treg defectuosa por linfocitos T CD4 no sensibles a TGF β . D) Colocalización de GARP o LAP y CD31 en cortes hepáticos de ratones de tipo silvestre revelados por microscopía confocal. E) Expresión de GARP y LAP (líneas continuas) por LSEC recién aisladas (paneles superiores) o DC esplénicas (paneles inferiores) determinada por citometría de flujo (controles de isotipo en gris). F) Se estimularon células no Treg CD4⁺CD25⁻ específicas de MBP mediante LSEC con péptido MBP y se transfirieron a ratones B10.PL (10⁵ células/ratón, n = 8), en los que se había inducido EAE. Los ratones control recibieron PBS (n = 9). Se presenta el promedio de las puntuaciones EAE \pm e.e.m.; P = 0,0025.

Fig. 7: Administración dirigida de péptidos MBP a LSEC con nanopartículas. A) Tasas de eliminación plasmática del péptido MBP acoplado a ⁵⁹Fe-NP (MBP-⁵⁹Fe-NP) y péptido ¹⁴C-MBP acoplado a NP no marcadas (¹⁴C-MBP-NP). B) Distribución en órganos de MBP-⁵⁹Fe-NP y ¹⁴C-MBP-NP 60 min después de la inyección intravenosa. Se muestran los valores medios \pm e.e.m. (n = 4). C) Imágenes de RM coronal y transversal representativas de ratones antes y después de la inyección de NP no cargadas o MBP-NP. D) Microscopía confocal intravital del hígado mostrando la captación de MBP-NP o NP no cargadas por LSEC. También se tiñeron los núcleos. Panel derecho: LSEC (FITC-dextrano), panel izquierdo: NP de punto cuántico marcada; barra de escala: 20 μ m. E) Microscopía electrónica del hígado, 60 minutos después de la inyección intravenosa de MBP-NP o NP no cargadas.

Fig. 8: La administración basada en nanopartículas de péptidos neuroantigénicos a LSEC previene la inducción de EAE. La EAE se indujo en ratones B10.PL de tipo silvestre (A, E) o tg4 (B) por inmunización a MBP. En ratones de tipo silvestre C57BL/6 (C) o ratones hCD2- Δ kt β R11 (D), se indujo EAE mediante inmunización a MOG. Un día después de la inducción de la EAE, los ratones se inyectaron una vez por vía intravenosa con PBS (A-E) o nanopartículas cargadas con péptido neuroantigénico (MBP-NP (A, B, E) o MOG-NP (C, D)). Como control, los ratones recibieron cantidades equivalentes de NP no cargadas (A, C) o péptido MBP no conjugado (B, E). Dos veces por semana, se inyectaron intraperitonealmente ratones tratados con MBP-NP con anticuerpo PC61 reductor de Treg (MBP-NP/reductor de Treg) o anticuerpo control de isotipo coincidente (MBP-NP). Se muestran las puntuaciones medias de EAE \pm e.e.m. (n = 5-7).

Fig. 9: Terapia de la EAE establecida mediante transferencia de péptido MOG basada en nanopartículas a LSEC. La EAE se indujo en ratones C57BL/6 mediante inmunización frente a MOG. Después de la aparición de la enfermedad (día 8-12, indicado por la flecha), los ratones se trataron con una sola inyección de nanopartículas cargadas con MOG (n = 10, línea gris) o PBS (n = 17, línea negra). A) Evolución de la EAE durante un período de observación extendido de más de nueve semanas después del tratamiento con MOG-NP (gris) o PBS (negro), se muestran puntuaciones medias de EAE \pm e.e.m. B) Cambio de la puntuación media de enfermedad individual después del tratamiento con MOG-NP (gris) o PBS (negro); "Puntuación de EAE" = diferencia de puntuación en comparación con el tiempo de tratamiento.

Fig. 10: Eficiencia del acoplamiento del péptido a las NP. Número calculado de moléculas de péptido acopladas a las NP después de incubación con cantidades crecientes de péptido MBP radiomarcado. Se muestran los valores medios \pm e.e.m. (n = 3).

Fig. 11: Conversión eficiente de Treg por LSEC *in vitro* usando péptido MBP conjugado con nanopartículas o péptido MBP libre. Se cocultivaron linfocitos T CD4⁺Foxp3⁻ esplénicos procedentes de ratones tg4 x Foxp3gfp.KI con LSEC en presencia de TGF β (2 ng/ml) y péptido MBP libre (5 ng/ml) o una dosis equivalente de péptido MBP acoplado a nanopartículas (MBP-NP) durante cuatro días. La inducción de Foxp3 en linfocitos T CD4⁺ se analizó a continuación mediante citometría de flujo. Para el análisis estadístico, se realizó la prueba de Mann-Whitney (MBP libre: 32,16 \pm 1,075, MBP-NP: 29,63 \pm 1,558, P = 0,2857). n.s. = no significativo.

Fig. 12: Características de NP y MBP-NP. A) Se midieron los potenciales Zeta de NP y MBP-NP a 20 °C usando un instrumento Malvern Zetasizer Nano-ZS. Ambas muestras exhiben una carga de superficie negativa comparable (potencial Zeta promediado de NP -58 mV, MBP-NP -61,6 mV) (MBP-NP: pico más alto, NP: pico más bajo). No se detectaron diferencias en el tamaño por B) cromatografía de exclusión de tamaño (MBP-NP:

línea izquierda, NP: línea derecha) o C) por microscopía electrónica de transmisión. Para la microscopía electrónica, las muestras se tiñeron con silicotungstato de sodio 1 %, pH 7, de manera que la capa orgánica aparece clara y el núcleo de óxido de hierro oscuro.

5 Fig. 13: Reducción del número de Treg CD45⁺CD3⁺CD4⁺ in vivo por administración repetida de anticuerpo PC61. Los ratones B10.PL se inmunizaron frente al péptido MBP y se trataron al día siguiente con PBS (n = 7) o nanopartículas acopladas al péptido MBP (MBP-NP). Los ratones que recibieron MBP-NP se trataron a continuación dos veces por semana con el anticuerpo PC61 reductor de Treg (n = 5) o con el anticuerpo de control de isotipo coincidente no reductor (n = 6). Los ratones se sacrificaron al día 29 después de la
10 inmunización y se analizaron los bazo para determinar la eficacia de la reducción del número de Treg mediante citometría de flujo. Los resultados se representan como el % medio de CD25⁺Foxp3⁺ de linfocitos CD4⁺ ± e.e.m. (PBS 17,16 ± 0,3422, MBP-NP + isotipo 15,08 ± 0,8594, MBP-NP + PC61 3,116 ± 0,4643, P <0,001). Para la comparación de grupos múltiples, se realizó el ANOVA unidireccional y la prueba de Tukey.

15 Fig. 14: Puntuaciones iniciales de EAE en el momento de la administración terapéutica de MOG-NP o PBS. Se inmunizaron ratones C57BL/6 contra el péptido MOG y desarrollaron síntomas clínicos de EAE. Después de la aparición de la enfermedad (día 8-12), los ratones fueron tratados con una sola inyección de nanopartículas cargadas con MOG (n = 10) o PBS (n = 17); en el momento del tratamiento, las puntuaciones medias de la enfermedad inicial entre los grupos no diferían (media ± e.e.m. : 1,59 ± 0,12 frente a 10,60 ± 0,19; P = 0,9195).
20

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de linfocitos T reguladores por células endoteliales sinusoidales hepáticas y células de Kupffer.

25 Se aislaron células hepáticas no parenquimatosas de ratón aplicando un protocolo modificado de (28). En resumen, los hígados de ratón se perfundieron con colagenasa IV al 0,05 % (Sigma, Taufkirchen, Alemania) en solución salina equilibrada de Gey, se diseccionaron mecánicamente y se digirieron adicionalmente en colagenasa IV al 0,05 % en solución salina equilibrada de Gey durante 25 minutos a 37 °C en rotación constante (240 rpm). Se sedimentaron los hepatocitos y los residuos celulares dos veces a 40 g y las células no parenquimatosas se recuperaron por centrifugación sobre un gradiente de Optiprep (Sigma) al 17 % a 400 g.
30

35 Las células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC) se purificaron a partir de las células no parenquimatosas según se describe (29) por clasificación magnética con el anticuerpo ME-9F1 (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Alemania). LSEC se sembraron en placas de cultivo revestidas con colágeno (Serva, Heidelberg, Alemania). Después de un cultivo durante la noche en el medio de Dulbecco modificado de Iscove suplementado con FCS al 5 %, las células no adherentes se eliminaron mediante un cambio del medio. Las células de Kupffer se purificaron consecuentemente a partir de las células no parenquimatosas mediante clasificación magnética con anticuerpo F4/80 biotinilado (eBioscience, Frankfurt, Alemania) y microperlas anti-biotina (Miltenyi).
40

En otra alternativa, los hepatocitos se aislaron a partir de hígados de ratón como se describe (30) y las células dendríticas se aislaron de bazo de ratón por separación de células magnéticas para CD11c como se describe (30).

45 Se sembraron 10⁵ LSEC, 10⁵ células de Kupffer o 5x10³ hepatocitos en placas de 96 pocillos y se utilizaron al día siguiente para la estimulación de linfocitos T CD4⁺CD25⁻. En otra alternativa, se sembraron 5x10⁴ células dendríticas en placas de 96 pocillos y se usaron el mismo día para la estimulación de linfocitos T CD4⁺CD25⁻. Estos linfocitos T no reguladores CD4⁺CD25⁻ se aislaron de bazo de ratón por separación magnética de células y a continuación se estimularon 5x10⁵ linfocitos purificados por pocillo en las células presentadoras de antígeno indicadas en medio libre de suero (Pan Biotech, Aidenbach, Alemania) con anticuerpo soluto anti-CD3 (BD Bioscience, Heidelberg, Alemania). Después de cuatro días de cultivo, se cosecharon los linfocitos T y se analizaron por citometría de flujo para determinar el porcentaje de linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. Como se ha indicado, el factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) se añadió a algunos cultivos de estimulación.
50

55 Resultados: Como se muestra en la Figura 1, las células dendríticas fueron malos inductores de Treg. En ausencia de TGFβ exógeno, la generación de linfocitos Treg inducida por células dendríticas fue despreciable y en presencia de TGFβ exógeno, solo el 7,5 % de los linfocitos T estimulados por células dendríticas fueron Treg. Por el contrario, los diferentes tipos de células hepáticas, LSEC, células de Kupffer y hepatocitos, eran inductoras eficaces de Treg, al menos en presencia de TGFβ exógeno, con al menos 20 % de linfocitos T estimulados con células hepáticas. En particular, las LSEC eran generadoras de Treg eficientes, ya que, en presencia de TGFβ, el 38 % de las células estimuladas eran Treg e incluso en ausencia de TGFβ exógeno, el 16,3 % de los linfocitos T estimuladas eran Treg.
60

Ejemplo 2: Supresión de la neuroinflamación autoinmunitaria experimental por linfocitos T CD4 estimulados con células endoteliales sinusoidales hepáticas

65 Las LSEC se aislaron como se describe en el ejemplo 1 y se usaron para estimular linfocitos T CD4⁺CD25⁻ no reguladores purificados de ratones tg4, que llevan un receptor de linfocitos T transgénico específico de la proteína

básica de mielina (25). Después de 4 días de estimulación de los linfocitos T con el péptido de la proteína básica de la mielina específico (5 ng/ml) en LSEC, realizada como se describe en el ejemplo 1, 10^5 de linfocitos T estimulados con LSEC se transfirieron a ratones B10.PL que habían sido inmunizados un día antes con un péptido de proteína básica de la mielina para inducir los síntomas clínicos de la encefalomiélitis autoinmunitaria experimental (EAE), como se describe en (25).

Resultados: La transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de la proteína básica de la mielina estimulados por LSEC induce un curso retardado y fuertemente mejorado de la EAE, lo que indica que los linfocitos Treg específicos de neuroantígenos inducidos por LSEC son capaces de mejorar la neuroinflamación autoinmunitaria.

Ejemplo 3: Direccionamiento selectivo y específico de nanopartículas a células endoteliales sinusoidales hepáticas *in vivo*

a) Se generaron nanopartículas sintetizando primero núcleos de óxido de hierro de aproximadamente 11 nm de acuerdo con (26) con 0,18 g de FeOOH, 2,31 g de ácido oleico y 6,4 ml (5,0 g) de 1-octadeceno; el protocolo se modificó interrumpiendo la reacción después de una hora para producir tamaños de núcleo más grandes de aproximadamente 11 nm.

A continuación, se siguió la encapsulación de los núcleos de acuerdo con (27) con algunas modificaciones: se añadieron 2 ml de solución de poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) ($c = 0,01$ g/ml en CHCl_3) a una solución de 2 mg de nanopartículas disueltas en 2 ml de cloroformo y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se evaporó después por exposición a una corriente constante de N_2 y se añadieron 2 ml de tampón TBE al 20 %. La solución se sonicó tres veces durante 10 minutos, dejando que la solución se enfriara entre ellos. Posteriormente, la solución se calentó a 60°C durante 10 minutos. Los agregados formados se eliminaron por centrifugación a 2400 g (tres veces durante 10 minutos) y el exceso de polímero se eliminó por ultracentrifugación (1 h, 50 000 g, 4°C). Finalmente, la solución se filtró secuencialmente a través de filtros con tamaños de poro de 0,45 μm , 0,2 μm y 0,1 μm . La calidad de las partículas se confirmó mediante cromatografía de exclusión de tamaño y microscopía electrónica de transmisión. El contenido de hierro se midió tratando 200 μl de una muestra diluida con 50 μl de ácido clorhídrico 5 M a 70°C durante 30 minutos (31). A continuación, se añadieron 150 μl de un tampón de acetato 2 M (pH = 4,8) que contenía ácido ascórbico al 10 % a 50 μl de cada muestra, seguido de 100 μl de una solución de 50 mg de batofenantrolina en 50 ml de agua. Después de 15 minutos, se midió la absorción a 540 nm. El diseño general de las nanopartículas se ilustra en la Figura 3.

b) Se generaron nanopartículas comparativas, nanosomas que comprenden una bicapa lipídica, por el procedimiento descrito en Bruns, et al., Nat. Nanotechnol. 2009,4 193-201.

Resultados:

a) Se inyectaron las nanopartículas obtenidas en ratones y, según se determinó mediante resonancia magnética, se observó que se acumulaban específicamente en el hígado. Además, el marcaje radioactivo de los núcleos con ^{59}Fe mostró que aproximadamente el 80 % de las partículas inyectadas se retenían en el hígado. Para confirmar el hepatotropismo e identificar más detalladamente las células diana específicas, se usaron núcleos semiconductores fluorescentes CdSe/ZnS (puntos cuánticos), como se describe en (32), como núcleo en lugar de óxido de hierro, dejando la cápsula y la superficie de contacto de las nanopartículas sin cambios. La microscopía intravital se realizó después de la inyección de estas nanopartículas fluorescentes en ratones, lo que demuestra que estas nanopartículas se acumulan rápidamente predominantemente en las LSEC (Figura 4A). Una pequeña fracción de las nanopartículas inyectadas se encontró en las células de Kupffer o en algunas células endoteliales de las venas intestinales que alimentan la vena porta.

Las nanopartículas obtenidas para su uso en la invención se inyectaron adicionalmente en ratones y se observó que se acumulaban en células endoteliales sinusoidales hepáticas según se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 4B).

b) Como comparación, se inyectaron nanosomas fluorescentes preparados de acuerdo con Bruns et al., 2009, en ratones en los que dos días antes se habían reducido las células de Kupffer mediante la inyección de liposomas que contenían clodronato (Figura 4C: b) o en los que no se habían reducido las células de Kupffer mediante la inyección de liposomas simulados (Figura 4C: a). En ratones de control tratados simultáneamente, los liposomas son internalizados por las células de Kupffer, como se deduce del patrón de tinción característico. En los ratones tratados con clodronato, la absorción de las partículas se redujo sustancialmente, lo que confirma que los nanocristales incrustados en las lipoproteínas son efectivamente internalizados por las células de Kupffer. La Figura 4C muestra que los nanosomas se acumulan en células de Kupffer, pero no en las LSEC.

Ejemplo 4: Tratamiento de la neuroinflamación experimental con nanopartículas cargadas con autoantígeno *in vivo*

Para la conjugación covalente del péptido neuroantigénico (péptido Ac1-9 encefalitogénico derivado de la secuencia de aminoácidos de la proteína básica de la mielina), se sintetizaron nanopartículas con un núcleo de óxido de hierro

como se describe en el ejemplo 3 y se ajustaron a una concentración de 6 $\mu\text{mol/l}$ en tampón SBB 50 mM (pH = 9). Se añadió una cantidad igual de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida ($c = 60 \text{ nmol/l}$), disuelta en un tampón SBB 50 mM (pH = 9). Después de 5 minutos, se añadió un exceso de 1000 veces del péptido neuroantigénico y la solución se incubó bajo rotación durante 2 h a temperatura ambiente y luego durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, la solución se filtró bajo fuerza centrífuga en un dispositivo de filtro (100 kDa, 2500 g, 4 °C) y el resto se resuspendió en PBS. Este procedimiento se repitió 20 veces para eliminar todo el péptido en exceso. Los conjugados péptido-partícula obtenidos se disolvieron en PBS y se sometieron a cromatografía de exclusión de tamaño para asegurar la ausencia de péptido libre. A continuación, se midió el contenido de hierro para determinar la concentración de la suspensión péptido-partícula.

Resultados: Las nanopartículas cargadas con péptido así obtenidas o, como control, las nanopartículas sin péptidos no conjugadas se inyectaron a continuación en ratones B10.PL ($n = 6$), un día después de la inducción de la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) por inmunización contra el péptido de la proteína básica de la mielina Ac1-9 (25). Como se muestra en la Figura 5, solo las nanopartículas cargadas con neuropéptido indujeron una protección completa frente a la EAE clínica. Por el contrario, las nanopartículas sin péptido no protegieron de la EAE y los ratones desarrollaron puntuaciones clínicas de EAE que eran similares a las de los ratones tratados con PBS.

Ejemplo 5: Control de la autoinmunidad mediado por linfocitos T-reg mediante la administración de antígeno basado en nanopartículas a células hepáticas tolerogénicas

Las células dendríticas (DC) hepáticas, las células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC) y las células de Kupffer (KC) son células presentadoras de antígeno residentes en el hígado que expresan constitutivamente moléculas MHC II y que son capaces de estimular los linfocitos T CD4^+ . Para probar si estas células hepáticas están implicadas en la inducción de los linfocitos Treg, se utilizaron DC hepáticas primarias, LSEC o KC para estimular células no Treg $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^-$ del bazo de ratones F1 ($\text{tg4} \times \text{Foxp3gfp.KI}$) F1. Estas células no Treg reconocen específicamente la proteína básica de la mielina (MBP) y permiten el seguimiento de la conversión de Treg basado en la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) ligada a Foxp3. La estimulación de las células no Treg se realizó en presencia del péptido MBP específico y del $\text{TGF}\beta$ exógeno, que se requiere para la conversión de Treg. Todos los tipos de células hepáticas ensayadas fueron capaces de inducir linfocitos Treg Foxp3^+ específicos de MBP; sin embargo, las LSEC fueron más eficientes en la inducción de Treg que las KC y las DC hepáticas (Figura 6A). A continuación se ensayó la capacidad de las células hepáticas para proporcionar señales de $\text{TGF}\beta$ en ausencia de $\text{TGF}\beta$ exógeno. Las DC y las KC hepáticas no fueron eficientes en la inducción de Treg (Figura 6B), mientras que las LSEC podían inducir la conversión de Treg a mayores tasas (Figura 6B). Para confirmar que las LSEC pueden proporcionar señales de $\text{TGF}\beta$ que promueven la conversión de Treg, las células no Treg $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ de ratones F1 ($\text{hCD2-}\Delta\text{KT}\beta \text{ RII} \times \text{tg4}$) fueron estimulados en las LSEC; estos linfocitos T portan un receptor de $\text{TGF}\beta$ tipo II dominante-negativo y por lo tanto muestran una sensibilidad reducida a $\text{TGF}\beta$. Los inventores observaron tasas de conversión fuertemente reducidas de linfocitos T insensibles a $\text{TGF}\beta$ a Treg Foxp3^+ , en comparación con los linfocitos T de tipo silvestre (Figura 6C), lo que indica que la eficiencia de las LSEC para inducir Treg depende de la señalización de $\text{TGF}\beta$. Aunque las LSEC parecen proporcionar señales de $\text{TGF}\beta$ para la inducción de Treg (Figura 6B), no se detectó $\text{TGF}\beta$ activo en sobrenadantes de LSEC (no se muestra). Por lo tanto, los inventores probaron si las LSEC habían unido $\text{TGF}\beta$ a su membrana; en el complejo con péptido asociado a la latencia (LAP) (40, 41), el $\text{TGF}\beta$ puede estar sujeto a la superficie de las células a través de las repeticiones de glicoproteína-A predominantes (GARP, también conocido como LRRC32) (42). Se demostró que $\text{TGF}\beta$ unido a la membrana induce un fenotipo tolerogénico y una expresión de Foxp3 en linfocitos T estimulados (41). De hecho, los inventores observaron mediante inmunohistoquímica que GARP, así como LAP estaban colocalizados con LSEC CD31^+ (Figura 6D), mientras que la expresión de GARP y LAP no se puede detectar en otras células hepáticas. La cuantificación de la expresión de GARP y LAP por citometría de flujo confirmó la expresión en la superficie celular de GARP y LAP por las LSEC, pero no por las DC esplénicas (Figura 6E). Estos hallazgos indican que las LSEC pueden inducir eficientemente Treg específicos del antígeno a través del $\text{TGF-}\beta$ unido a membrana.

A continuación, se generaron *in vivo* linfocitos Treg específicos de MBP inducidos por LSEC y se probó su funcionalidad supresora *in vivo* en un modelo de ratón de esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE). Mientras que el grupo control desarrolló EAE clínica, los ratones que recibieron linfocitos Treg específicos de MBP inducidos por LSEC (Figura 6F; T (LSEC) estaban casi completamente protegidos contra la EAE inducida por MBP. Sin embargo, este efecto supresor se limitó a aproximadamente tres semanas, lo que indica que los linfocitos Treg transferidos no eran estables. Los inventores razonaron que se podía conseguir una estabilidad de los linfocitos Treg más sostenida y protección frente a la EAE mediante la inducción Treg específicos del antígeno por las LSEC *in vivo*.

Para desarrollar un método para la administración selectiva de autoantígeno a LSEC *in vivo*, los inventores utilizaron nanopartículas (NP) que se eliminan rápidamente de la circulación por absorción por las células hepáticas. Específicamente, los inventores aprovecharon una nanopartícula revestida de polímero (43), la cual se observó que se acumulaba selectivamente en el endotelio sinusoidal hepático (datos no mostrados). Para generar un sistema portador de antígeno eficaz, se eligió una estrategia de acoplamiento simple de una etapa usando un método de reticulación de carbodiimida para unir el péptido MBP a nanopartículas revestidas con polímero con núcleo de óxido

de hierro superparamagnético. Cada nanopartícula se cargó al máximo con 100 moléculas peptídicas por nanopartícula como se demostró mediante ensayos de unión con péptido MBP marcado radiactivamente con ^{14}C (Figura 10). La carga de péptidos no influyó en el tamaño, la forma y la carga de las nanopartículas como se determinó mediante la medición del potencial Zeta, la cromatografía de exclusión por tamaños y la microscopía electrónica (Figura 12). Para investigar si la carga de péptidos MBP alteraba la farmacocinética y el tropismo de nuestras nanopartículas, se realizaron estudios cinéticos de recambio con conjugados de péptido MBP marcado radiactivamente con ^{14}C -nanopartícula (^{14}C -MBP-NP) en comparación con nanopartículas marcadas radiactivamente con ^{59}Fe conjugadas con el péptido MBP no marcado (MBP- ^{59}Fe -NP). Ambos marcadores radiactivos fueron eliminados con una cinética similar (Figura 7A), fundamentalmente por el hígado (Figura 7B). Se detectaron bajas cantidades de radioactividad en el bazo y el riñón, mientras que la captación en otros órganos fue insignificante. Además, la captación en órganos se visualizó por resonancia magnética dinámica, revelando solo la diana hepática de ambas nanopartículas cargadas y no cargadas con péptido (Figura 7C, Tabla 1 (a continuación). Por lo tanto, los péptidos MBP no se excretan a través del riñón, sino que se transportan por el efecto de direccionamiento deseado de las nanopartículas para su uso en la invención a las células hepáticas.

Para investigar más a fondo el tropismo celular de los conjugados de péptido-nanopartícula administrados, se aplicó microscopía de fluorescencia confocal convencional así como intravital del hígado, usando nanopartículas con un núcleo de punto cuántico fluorescente (44). Antes de la administración de los conjugados de péptido-nanopartícula de MBP fluorescentes, se inyectaron ratones receptores con FITC-dextrano que fue rápidamente absorbido por las LSEC. Después de la inyección intravenosa de las BMP-nanopartículas o de las nanopartículas no cargadas, los inventores observaron una rápida acumulación tanto de nanopartículas no cargadas como de nanopartículas cargadas con péptido MBP en el hígado, las cuales se colocalizaban claramente con LSEC teñidas con FITC-dextrano (Figura 7D). Para confirmar adicionalmente la captación de nanopartículas cargadas con péptido y no cargadas por las LSEC, se aplicó microscopía electrónica de transmisión de cortes hepáticos y se detectó una internalización importante de conjugados péptido MBP-nanopartícula en compartimentos endosómicos de las LSEC (Figura 7E). Para confirmar que el péptido administrado se puede presentar a los linfocitos T, se estudió la conversión de Treg *in vitro* por las LSEC en presencia de péptido MBP libre o de péptido MBP unido a nanopartículas (MBP-NP). Los inventores observaron que la generación de Treg se producía con una eficacia similar (Figura 11), lo que indica que el péptido MBP administrado mediante nanopartículas era presentado eficientemente a los linfocitos T. En conjunto, estos hallazgos demuestran que estas nanopartículas, con o sin carga peptídica, son captadas selectivamente por las LSEC *in vivo*, facilitando así la administración selectiva de péptidos antigénicos a las LSEC.

Tabla 1: Parámetros detallados de las secuencias de RM utilizadas para las mediciones *in vivo* en animales. Abreviaturas: Secuencia rápida de eco de campo (FFE), Campo de visión (FoV), Ángulo de inclinación de excitación (FA), Tiempo de repetición (TR), Tiempo de eco (TE), Número de señales obtenidas (NSA). Las mediciones se realizaron en el modo de adquisición de imágenes a una temperatura ambiente de 22 °C.

	FoV [mm]	matriz	grosor del corte [mm]	volumen efectivo del vóxel (μm^3)	cortes	FA [°]	TR [ms]	TE [ms]	NSA	intervalo dinámico [s]	tiempo de exploración total [min]
FFE multicorte coronal ponderada en T2*	100 x 35	448	1	223 x 223 x 1000	22	30	602	6,9	4	N/A	3:59
FFE multicorte transversal ponderada en T2*	35 x 35	288	1	208 x 208 x 1000	20	80	353	6,9	4	N/A	3:02
FFE transversal dinámica ponderada en T2*	34 x 34	160	1,3	213 x 213 x 1100	1	20	29	6,9	8	1,42	17:16

El efecto inmunosupresor propuesto de las MBP-nanopartículas *in vivo* se probó por primera vez en la EAE inducida por MBP en ratones B10.PL (Figura 8A). Una única inyección intravenosa de nanopartículas cargadas con péptido MBP un día después de la inducción de la EAE provocó una protección duradera y casi completa de la EAE clínica; por el contrario, los ratones control tratados con PBS o con nanopartículas no cargadas desarrollaron síntomas clínicos de EAE (Figura 8A). Sorprendentemente, incluso los ratones tg4 (45), que representan los linfocitos T CD4⁺ específicos de MBP T y desarrollan EAE más grave, fueron protegidos de la enfermedad con una única inyección de MBP-NP un día después de la inducción de la EAE (Figura 8B); los ratones de control que recibieron una dosis equivalente de péptido MBP libre, por el contrario, desarrollaron EAE grave (Figura 8B). Para confirmar la eficacia del enfoque de tratamiento inventivo en otro modelo de enfermedad independiente, se ensayó el efecto de nanopartículas cargadas con péptidos de glicoproteína de oligodendrocito de mielina (MOG) sobre el desarrollo de EAE inducida por MOG en ratones C57BL/6. De acuerdo con las observaciones de los inventores en la EAE inducida por MBP en ratones B10.PL, la administración de nanopartículas cargadas con péptido MOG a ratones C57BL/6 un día después de la inducción de la EAE, evitó de manera duradera a los ratones receptores desarrollar cualquier síntoma de enfermedad clínica; por el contrario, los ratones de control que reciben nanopartículas no cargadas desarrollaron EAE (Figura 8C).

Como los inventores han demostrado anteriormente que la inducción de tolerancia por las LSEC requería la señalización de TGFβ a los linfocitos T, razonaron que el direccionamiento basado en nanopartículas de péptidos autoantígenos a las LSEC debería ser ineficaz en ratones con linfocitos T insensibles a TGFβ. De hecho, las nanopartículas cargadas con péptido MOG indujeron solo un grado menor de protección contra EAE en ratones hCD2-ΔkTβRII (46), que presentan linfocitos T no sensibles a TGFβ (Figura 8D). Así, se puede concluir que también *in vivo*, la eficacia de la inducción de tolerancia mediada por nanopartículas depende de la señalización de TGFβ a los linfocitos T. Para confirmar que la protección mediada por nanopartículas de la EAE dependía de la función de los linfocitos Treg *in vivo*, se redujo el número de Treg en ratones que habían recibido MBP-nanopartículas mediante la administración repetida del anticuerpo PC61 que reconoce CD25 (47) (Figura 8E); la eficacia de la reducción se confirmó mediante citometría de flujo (Figura 13). Aunque la administración de MBP-nanopartículas inducía la protección frente a la EAE en ratones de control, las MBP-nanopartículas no pudieron evitar el desarrollo de la enfermedad en ratones en los que se había reducido el número de Treg (Figura 8E). De hecho, la gravedad de la enfermedad precipitada por la reducción de Treg fue similar a la gravedad de la enfermedad del grupo control que recibió PBS en lugar de BMP-nanopartículas (Figura 8E), lo que demuestra que los linfocitos Treg están implicados de forma decisiva en la inducción de la tolerancia mediada por nanopartículas *in vivo*.

Habiendo determinado que la NP cargada con péptido autoantígeno previno eficazmente el desarrollo de la enfermedad autoinmunitaria, los inventores abordaron la cuestión aún más importante de si las nanopartículas cargadas con péptido son un tratamiento eficaz de la enfermedad autoinmunitaria establecida. Así, indujeron primero la EAE clínica en ratones C57BL/6 mediante inmunización con MOG. En el momento del tratamiento, tanto los receptores de nanopartículas cargadas con péptido MOG como los ratones control mostraron síntomas clínicos manifiestos con puntuaciones de enfermedad similares (Figura 14). El grupo de control progresó en la gravedad de la EAE; por el contrario, las puntuaciones clínicas medias de los ratones tratados con MOG-NP mejoraron rápidamente y sustancialmente (Figura 9A, Figura 9B). Hay que señalar, la tolerancia inducida por una sola inyección terapéutica de nanopartículas cargadas con péptido MOG continuó a lo largo de un período de seguimiento prolongado de 9 semanas (Figura 9A, Figura 9B). En conclusión, la administración de autoantígeno mediada por nanopartículas a las LSEC es terapéuticamente eficaz en la enfermedad autoinmunitaria.

Considerados en conjunto, los resultados de los inventores indican que la administración dirigida basada en nanopartículas de péptidos autoantigénicos a LSEC que induce Treg *in vivo* puede restaurar la tolerancia inmunitaria a sí mismo y servir de tratamiento eficaz de la enfermedad autoinmunitaria. Por lo tanto, este enfoque ofrece una solución al problema de la aplicación de una terapia basada en Treg para la enfermedad autoinmunitaria proporcionando una metodología eficiente para inducir linfocitos Treg específicos de antígeno *in vivo*. Las LSEC son particularmente adecuadas como células diana para la administración de antígeno tolerogénico, ya que inducen la tolerancia de los linfocitos T y no promueven respuestas efectoras de linfocitos T inflamatorias. También se están explorando nanopartículas dirigidas a las DC esplénicas como herramientas para la inducción de la tolerancia específica del antígeno. Sin embargo, las DC muestran un alto grado de plasticidad y pueden diferenciarse fácilmente a células inflamatorias, mientras que las LSEC muestran un fenotipo que induce una sólida tolerancia incluso en presencia de señales proinflamatorias. Por lo tanto, la administración de autoantígenos a LSEC tolerogénicas robustas proporciona una mayor seguridad, en particular cuando se intenta tratar a individuos con una inflamación en curso.

Las nanopartículas son más comúnmente modificadas por la unión de ligandos específicos a su superficie con el fin de evitar su rápida eliminación por el hígado y redirigirlas a dianas específicas, por ejemplo, a las células cancerosas. Sin embargo, la eficacia del direccionamiento de tal redireccionamiento está todavía limitada por la absorción indeseada en el hígado. Aprovechando la absorción altamente selectiva de nanopartículas por las LSEC, el enfoque de la invención evita el direccionamiento erróneo del autoantígeno a células potencialmente inflamatorias. De hecho, esta administración eficiente y selectiva a las LSEC puede explicar la eficacia de tratamiento estable y potente inducida una sola administración de nanopartículas cargadas con péptido.

Los datos de los inventores proporcionan una prueba preliminar de que la inducción de la tolerancia específica del antígeno *in vivo* puede lograrse mediante la administración de antígeno basado en nanopartículas a las LSEC. Estos hallazgos permiten el desarrollo de un tratamiento eficaz basado en linfocitos Treg para enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias humanas en las que se han identificado los antígenos determinantes.

5

Referencias

1. Hogquist, K.A., Baldwin, T.A., and Jameson, S.C. 2005. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 772-782
2. Goodnow, C.C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B., and Vinuesa, C.G. 2005. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature.* 435: 590-597.
3. Jonuleit, H., and Schmitt, E. 2003. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J. Immunol.* 171: 6323-6327.
4. Cohen, I.R. 2001. *Tending Adam's garden: evolving the cognitive immune self.* Academic Press. New York, USA. 266 pp.
5. Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 199: 971-979.
6. von Herrath, M.G., and Harrison, L.C. 2003. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 223-32.
7. Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4: 330-336.
8. Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 6: 345-352.
9. Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. 2006. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol. Rev.* 212: 114-130.
10. Huber, S., and Schramm, C. 2006. TGF-beta and CD4+CD25+ regulatory T cells. *Front. Biosci.* 11: 1014-1023.
11. Shevach, E.M. 2009. Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30: 636-645.
12. Von Boehmer, H. 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* 6: 338-344.
13. Gavin, M.A., Clarke, S.R., Negrou, E., Gallegos, A., and Rudensky, A. 2002. Homeostasis and anergy of CD4(+)/CD25(+) suppressor T cells *in vivo*. *Nat. Immunol.* 3: 33-41.
14. Walker, L.S., Chodos, A., Eggena, M., Dooks, H., and Abbas, A.K. 2003. Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* 198: 249-258.
15. Liang, S., et al. 2005. Conversion of CD4+ CD25- cells into CD4+ CD25+ regulatory T cells *in vivo* requires B7 costimulation, but not the thymus. *J. Exp. Med.* 201: 127-137.
16. Knoechel, B., Lohr, J., Kahn, E., Bluestone, J.A., and Abbas, A.K. 2005. Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *J. Exp. Med.* 202: 1375-1386.
17. Kretschmer, K., et al. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* 6: 1219-1227.
18. Quintana, F.J., et al. 2008. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature.* 453: 65-71.
19. Crispe, I.N. 2003. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 51-62.
20. Limmer, A., et al. 1998. Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment. *Eur. J. Immunol.* 28: 2395-2406.
21. Knolle, P.A., et al. 1999. Induction of cytokine production in naive CD4 (+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* 116: 1428-1440.
22. Limmer, A., et al. 2000. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T cell tolerance. *Nat. Med.* 6: 1348-1354.
23. Calne, R.Y., et al. 1969. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 223: 472-476.
24. Cantor, H.M., and Dumont, A.E. 1967. Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system. *Nature* 215: 744-745.
25. Lüth, S., et al. 2008. Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs. *J. Clin. Invest.* 118: 3403-3410.
26. Yu, W.W., Falkner, J.C., Yavuz, C.T., and Colvin, V.L. 2004. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. *Chem. Commun.* 20: 2306-2307.
27. Shtykova, E.V., et al. 2008. Hydrophilic monodisperse magnetic nanoparticles protected by an amphiphilic alternating copolymer. *J. Phys. Chem. C* 112: 16809-16817.
28. Wiegand, C., Frenzel, C., Herkel, J., Kallen, K.J., Schmitt, E., and Lohse, A.W. 2005. Murine liver antigen presenting cells control suppressor activity of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hepatology* 42:193-199.
29. Schrage, A., et al. 2008. Murine CD146 is widely expressed on endothelial cells and is recognized by the monoclonal antibody ME-9F1. *Histochem. Cell. Biol.* 129:441-451.
30. Wiegand, C., et al. 2007. Defective T helper 1 response by hepatocyte-stimulated CD4 T cells impairs anti-viral CD8 response and viral clearance. *Gastroenterology* 133: 2010-2018.
31. Huberman, A., and Perez C. 2002. Nonheme iron determination. *Anal. Biochem.* 307: 375-378.

32. Wu, X. et al. 2002. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 21: 41-46.
33. Nguyen et al., 2004, *Gene Ther.* 11 (Suppl 1); S76-S84
34. Carambia et al. 2010, *J. Hepatol* 52, S59-S182.
- 5 35. Minchin 2008. *Nature Nanotechnol.* 3: 12-13.
36. Giri et al. 2011, *Acta Biophys Sin.* 1-7.
37. Shen et al. 2011, *Int. J. Nanomedicine* 6: 1229-1235.
38. Wu et al. *Mol. Pharm.* 6:1506-1517.
39. Bruns et al., *Nat. Nanotechnol.* 2009, 4:193-201.
- 10 40. H. L. Weiner, A. P. da Cunha, F. Quintana, H. Wu. *Immunol Rev* 241, 241-259 (2011).
41. J. Andersson, et al. *J Exp Med* 205, 1975-1981 (2008).
42. D. Q. Tran, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13445-13450 (2009).
43. T. Pellegrino, et al. *Nano Letters* 4, 703-707 (2004).
44. A. Bartelt, et al. *Nat Med* 17, 200-205 (2011).
- 15 45. G. Y. Liu, et al. *Immunity* 3, 407-415 (1995).
46. S. Huber, et al. *J Immunol* 173, 6526-6531 (2004).
47. J. Shimizu, S. Yamazaki, S. Sakaguchi. *J Immunol* 163, 5211-5218 (1999).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en la generación de linfocitos T reguladores específicos de al menos un epítipo de linfocito T en un sujeto para tratar o prevenir una enfermedad en la que la supresión de una respuesta inmunitaria específica es beneficiosa, en la que la composición comprende una nanopartícula, comprendiendo dicha nanopartícula.
- 10 a) una micela que comprende un polímero anfifílico que hace que la nanopartícula sea soluble en agua y
b) un péptido que comprende el al menos un epítipo de linfocito T asociado con el exterior de la micela.
- 15 2. La composición farmacéutica para su uso en la generación de linfocitos T reguladores específicos de al menos un epítipo de linfocito T en un sujeto para tratar o prevenir una enfermedad en la que la supresión de una respuesta inmunitaria específica es beneficiosa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la micela no comprende un núcleo sólido.
- 20 3. La composición farmacéutica para su uso en la generación de linfocitos T reguladores específicos de al menos un epítipo de linfocito T en un sujeto para tratar o prevenir una enfermedad en la que la supresión de una respuesta inmunitaria específica es beneficiosa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la micela recubre un núcleo hidrófobo sólido.
- 25 4. La composición farmacéutica para su uso en la generación de linfocitos T reguladores específicos de al menos un epítipo de linfocito T en un sujeto para tratar o prevenir una enfermedad en la que la supresión de una respuesta inmunitaria específica es beneficiosa de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el núcleo comprende un material inorgánico rastreable seleccionado del grupo que comprende óxido de hierro, CdSe/CdS/ZnS, plata y oro.
- 30 5. La composición farmacéutica para su uso en la generación de linfocitos T reguladores específicos de al menos un epítipo de linfocito T en un sujeto para tratar o prevenir una enfermedad en la que la supresión de una respuesta inmunitaria específica es beneficiosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en la que el diámetro del núcleo es de 5 a 30 nm, preferiblemente de 9 a 12 nm.
- 35 6. La composición farmacéutica para su uso en la generación de linfocitos T reguladores específicos de al menos un epítipo de linfocito T en un sujeto para tratar o prevenir una enfermedad en la que la supresión de una respuesta inmunitaria específica es beneficiosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el polímero es un polímero sintético seleccionado del grupo que comprende poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno), poli(anhídrido maleico-alt-1-tetradeceno) y copolímero de bloques de poliisopreno y bloques de poli(óxido de etileno), en el que el polímero es preferiblemente poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno).
- 40 7. La composición farmacéutica para su uso en la generación de linfocitos T reguladores específicos de al menos un epítipo de linfocito T en un sujeto para tratar o prevenir una enfermedad en la que la supresión de una respuesta inmunitaria específica es beneficiosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la nanopartícula está cargada negativamente.
- 45 8. La composición farmacéutica para su uso en la generación de linfocitos T reguladores específicos de al menos un epítipo de linfocito T en un sujeto para tratar o prevenir una enfermedad en la que la supresión de una respuesta inmunitaria específica es beneficiosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el péptido está unido covalentemente a la micela o asociado no covalentemente.
- 50 9. La composición farmacéutica para su uso en la generación de linfocitos T reguladores específicos de al menos un epítipo de linfocito T en un sujeto para tratar o prevenir una enfermedad en la que la supresión de una respuesta inmunitaria específica es beneficiosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la nanopartícula comprende un núcleo sólido que comprende óxido de hierro que tiene un diámetro de aproximadamente 9 a aproximadamente 12 nm, que está encapsulado por un revestimiento de poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) al que está unido covalentemente un péptido que comprende un epítipo de linfocito T.
- 55 10. La composición farmacéutica para su uso en la generación de linfocitos T reguladores específicos de al menos un epítipo de linfocito T en un sujeto para tratar o prevenir una enfermedad en la que la supresión de una respuesta inmunitaria específica es beneficiosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que las nanopartículas son adecuadas para transferir el péptido a células endoteliales sinusoidales hepáticas de un sujeto in vivo.
- 60 11. La composición farmacéutica para su uso en la generación de linfocitos T reguladores específicos de al menos un epítipo de linfocito T en un sujeto para tratar o prevenir una enfermedad en la que la supresión de una respuesta inmunitaria específica es beneficiosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición farmacéutica es adecuada para inducir la generación de linfocitos T reguladores específicos de al menos un epítipo a través de la presentación de dicho epítipo por células endoteliales sinusoidales hepáticas y/o células de Kupffer.
- 65

5 12. La composición farmacéutica para su uso en la generación de linfocitos T reguladores específicos de al menos un epítipo de linfocito T en un sujeto para tratar o prevenir una enfermedad en la que la supresión de una respuesta inmunitaria específica es beneficiosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que las nanopartículas están formuladas para administración a un sujeto que tiene una enfermedad en la que la supresión de una respuesta inmunitaria específica es beneficiosa.

10 13. La composición farmacéutica para su uso en la generación de linfocitos T reguladores específicos de al menos un epítipo de linfocito T en un sujeto para tratar o prevenir una enfermedad en la que la supresión de una respuesta inmunitaria específica es beneficiosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha enfermedad se selecciona del grupo que comprende una enfermedad autoinmunitaria, una alergia o una enfermedad en la que la inflamación es excesiva, crónica o adversa.

15 14. La composición farmacéutica para su uso en la generación de linfocitos T reguladores específicos de al menos un epítipo de linfocito T en un sujeto para tratar o prevenir una enfermedad en la que la supresión de una respuesta inmunitaria específica es beneficiosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, en la que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende esclerosis múltiple, diabetes tipo I, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, degeneración como consecuencia de un traumatismo o un ictus, enfermedad injerto contra hospedador, rechazo de un trasplante, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), asma y alergia.

Fig. 1

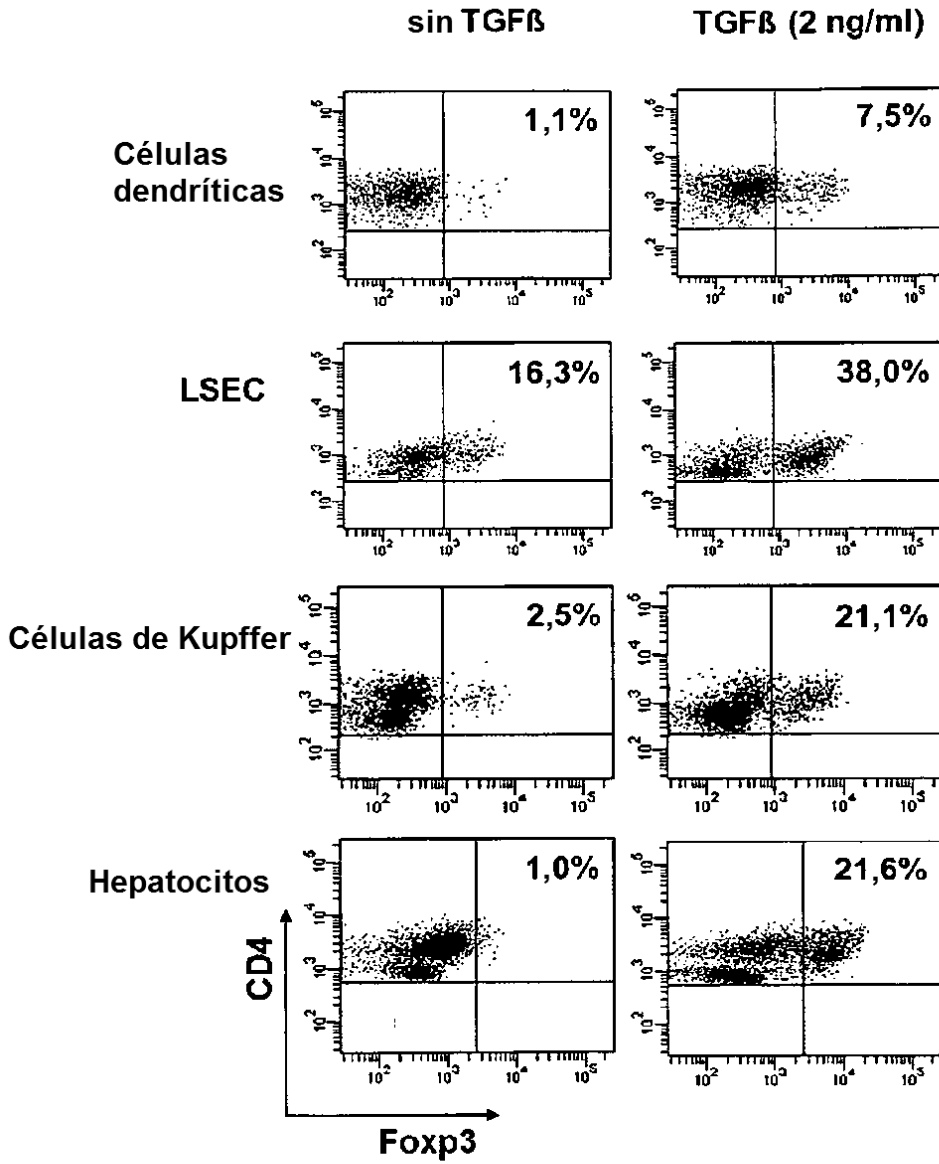


Fig. 2

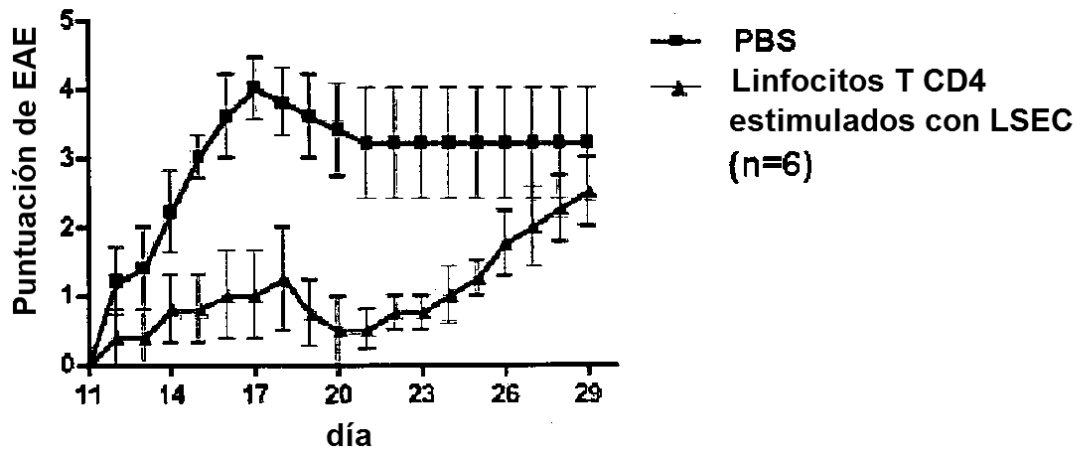
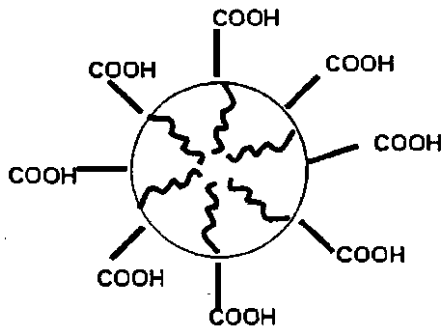


Fig. 3A



3B

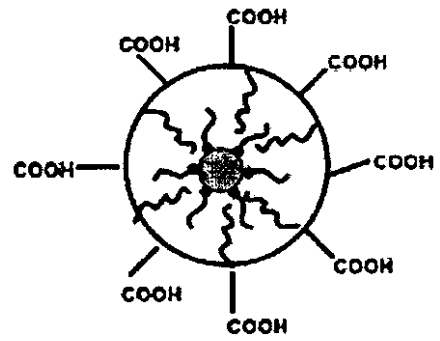


Fig. 4A

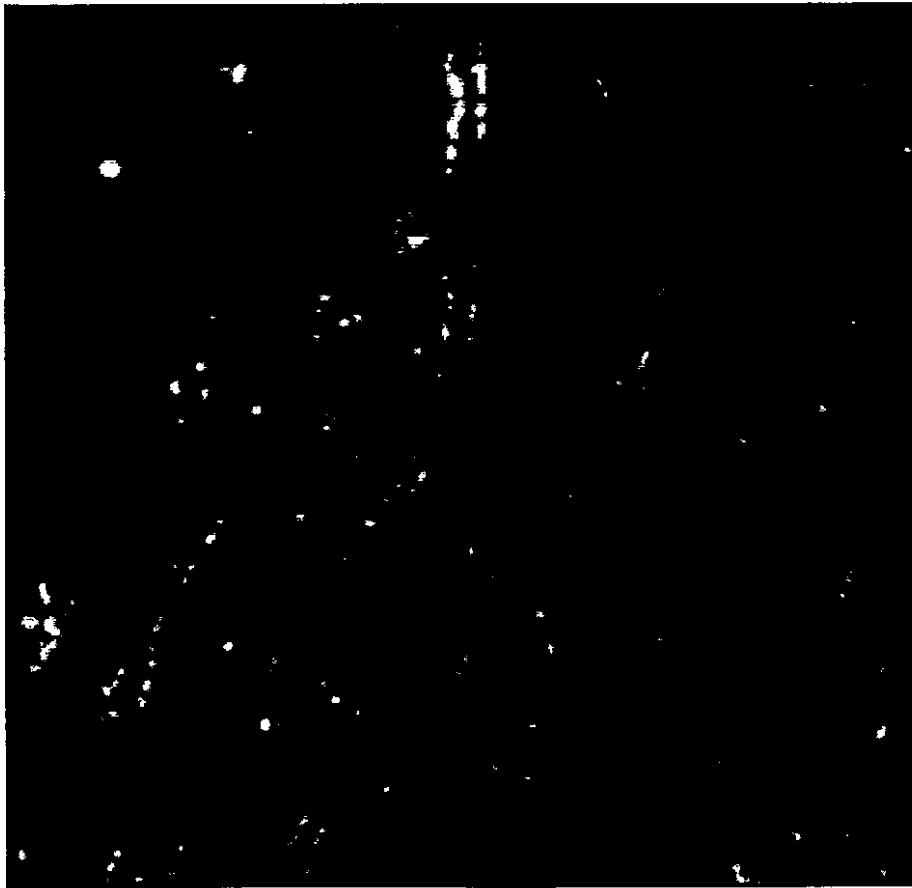


Fig. 4B

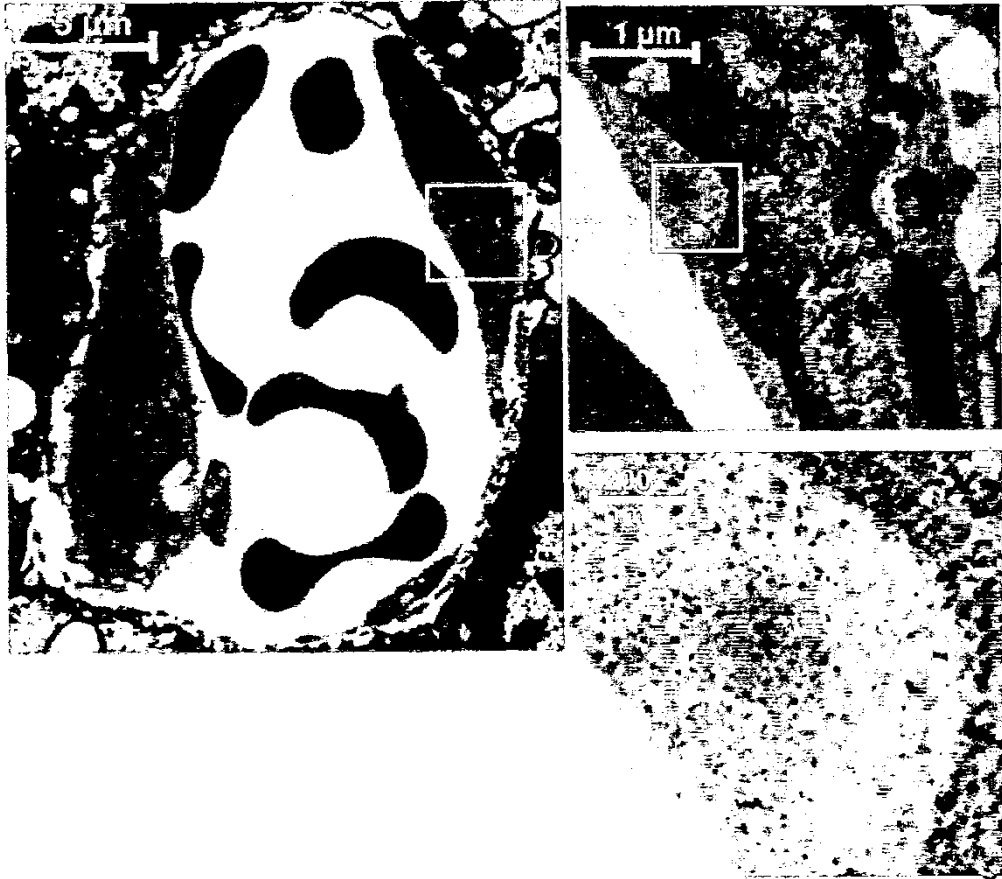


Fig. 4C

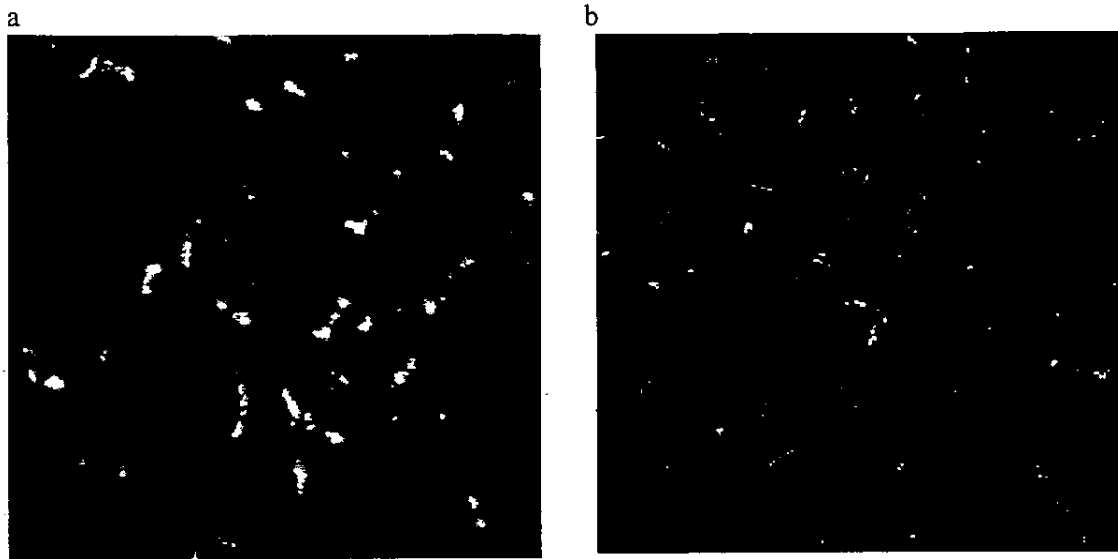


Fig. 5

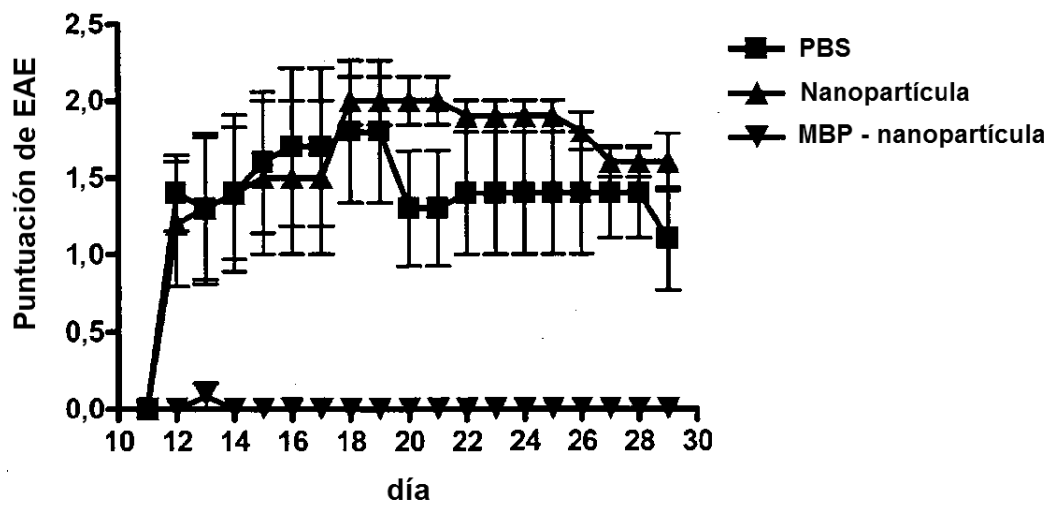


Fig. 6

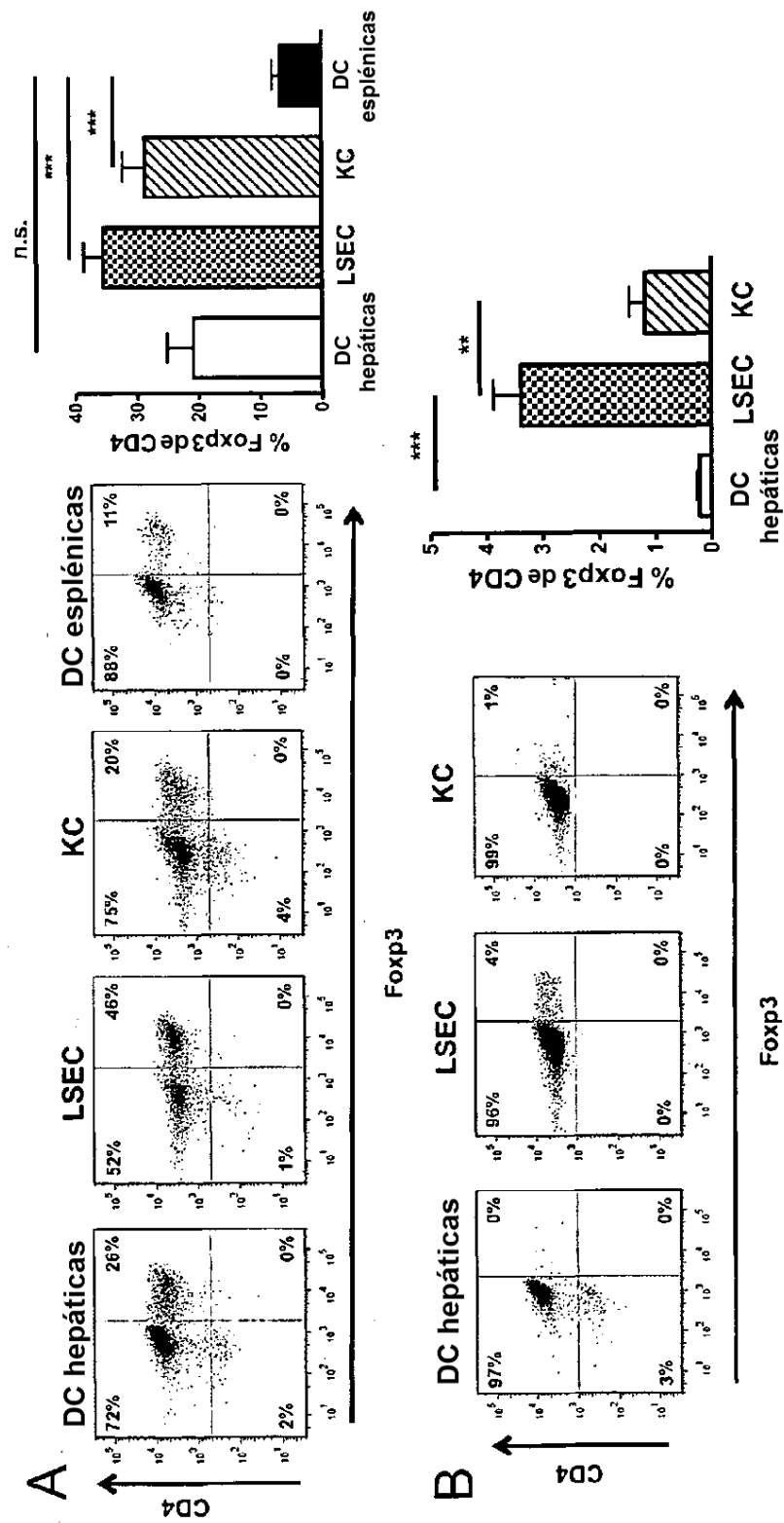


Fig. 6

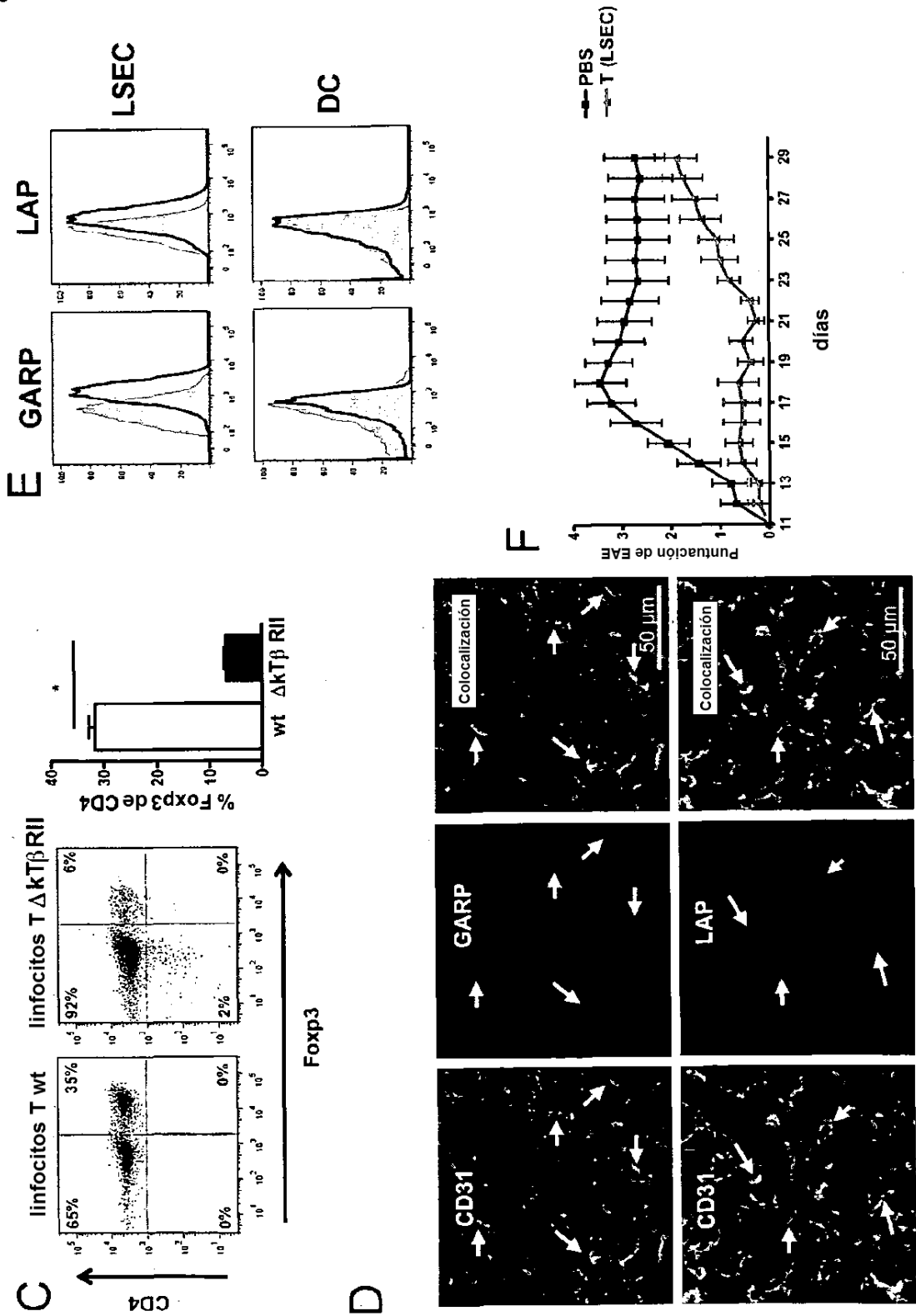


Fig. 7

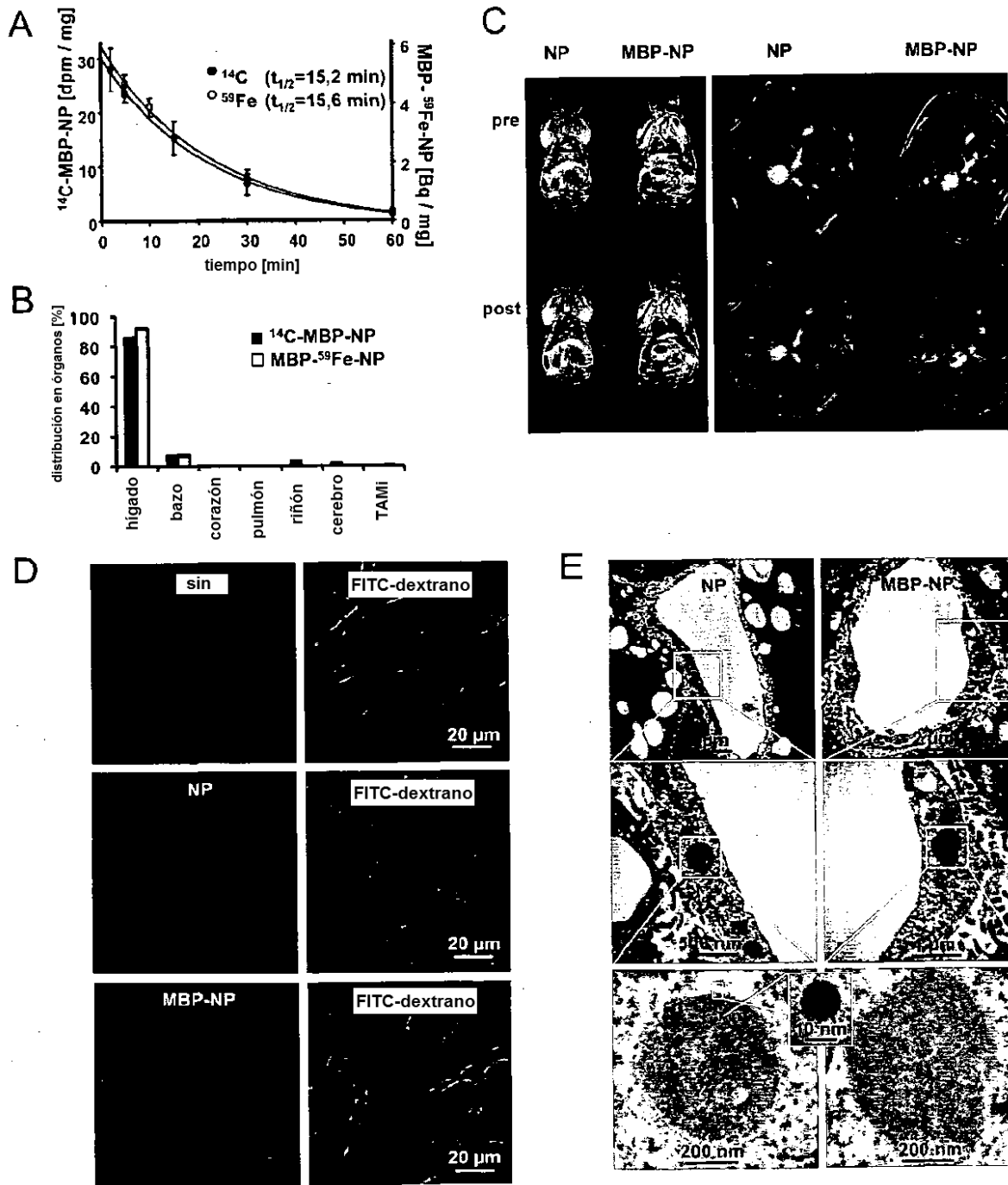


Fig. 8

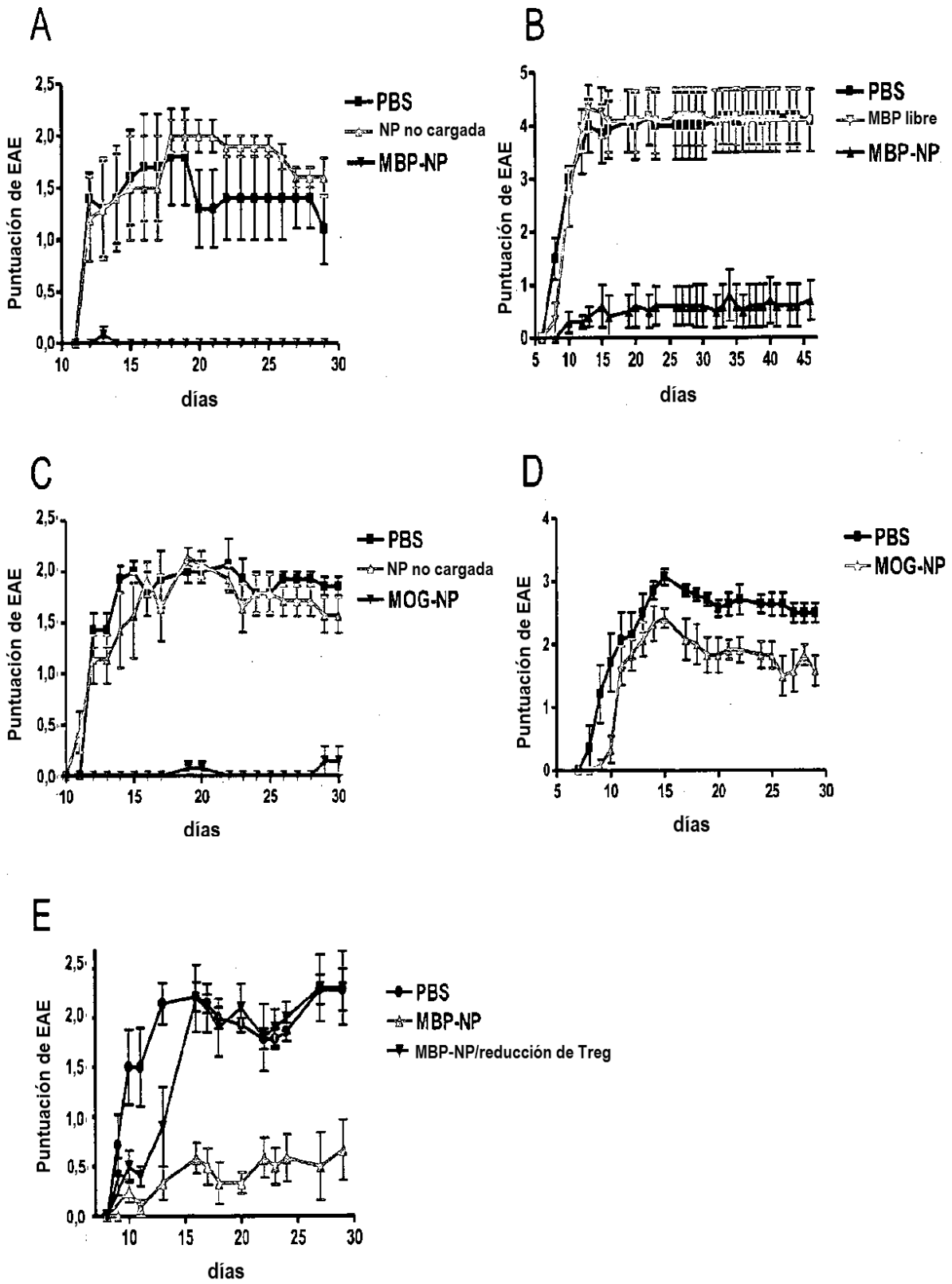


Fig. 9

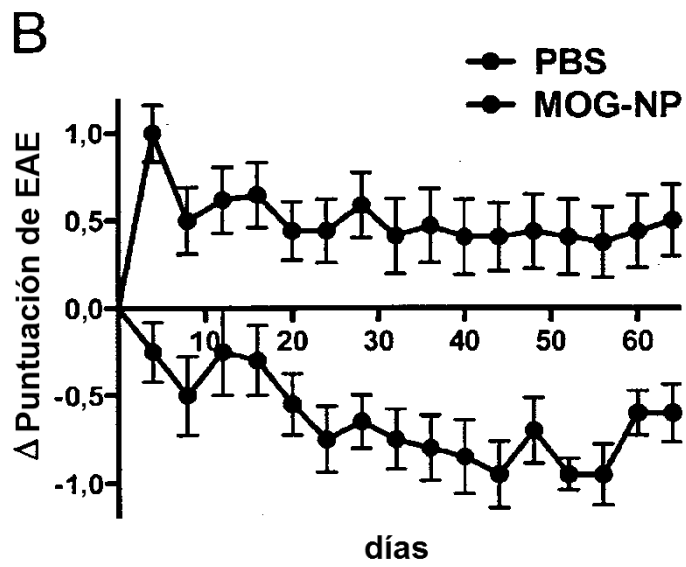
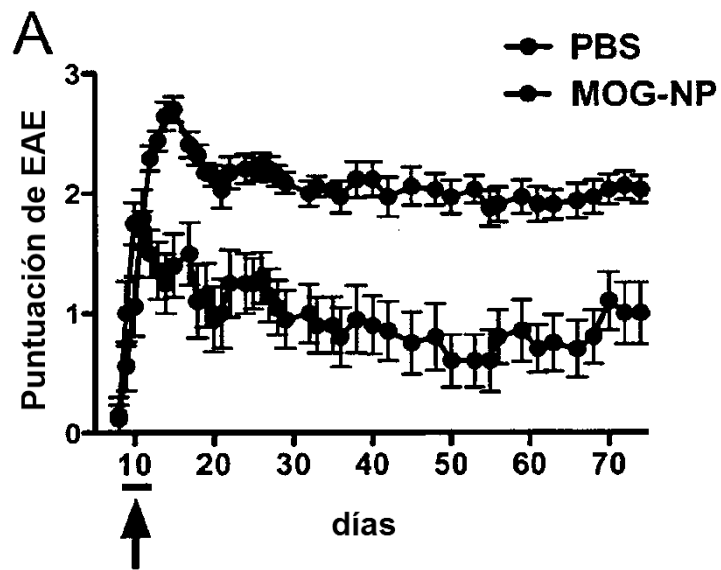


Fig. 10

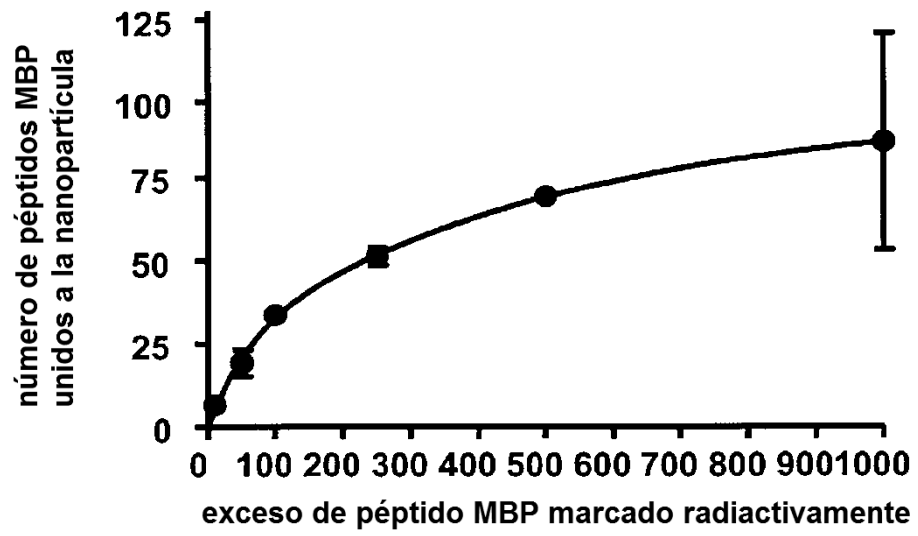


Fig. 11

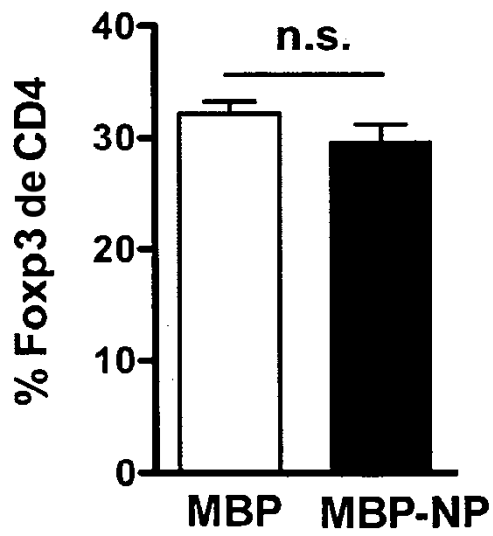


Fig. 12

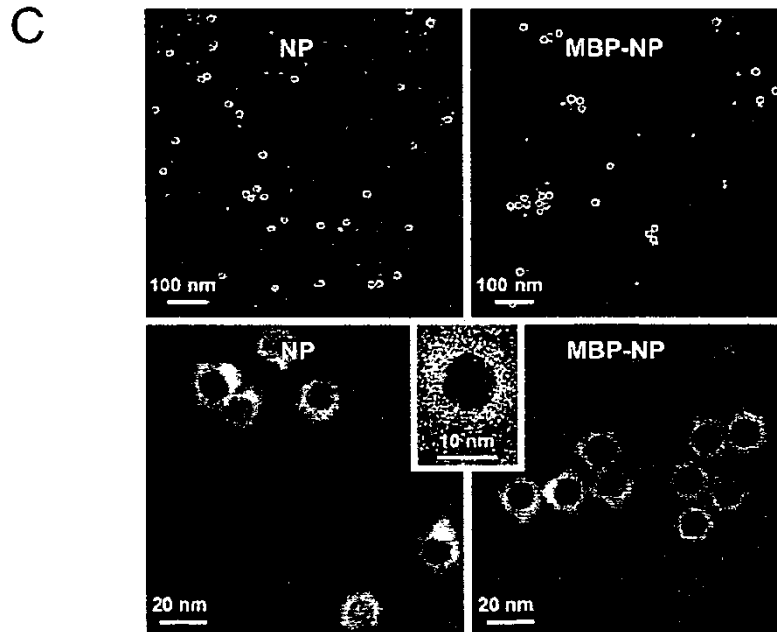
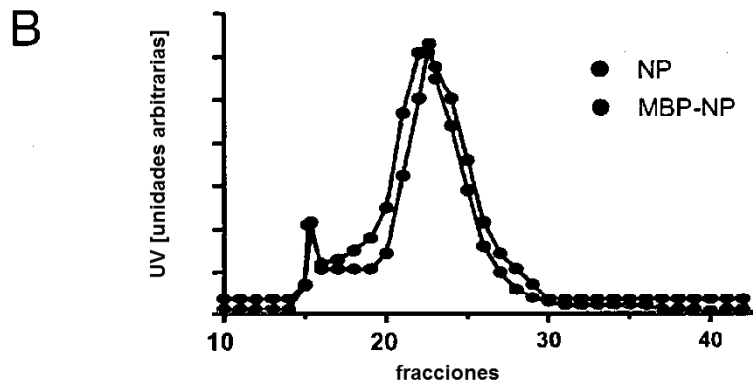
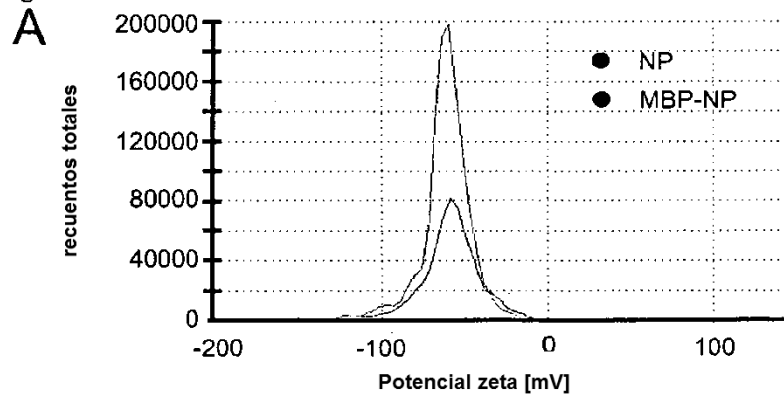


Fig. 13

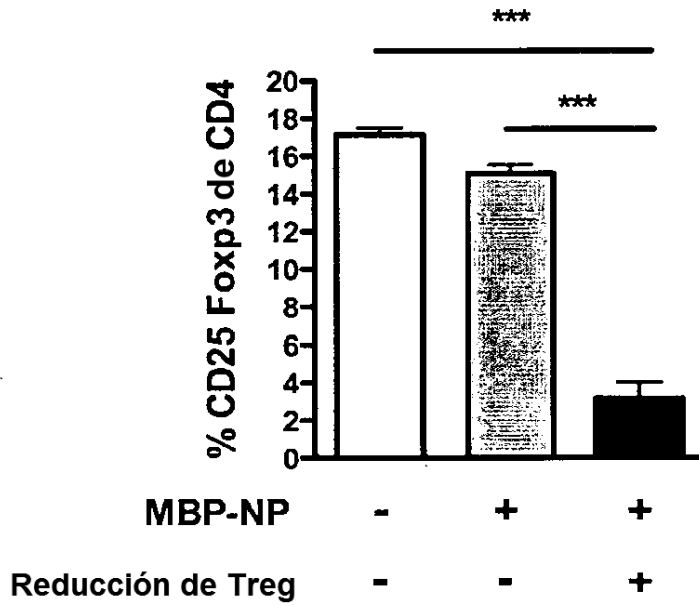


Fig. 14

