

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 155**

51 Int. Cl.:

A61K 47/69 (2007.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2008** **PCT/GB2008/003626**
87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2009** **WO09053718**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2008** **E 08840894 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017** **EP 2219609**

54 Título: **Composición inmunomoduladora**

30 Prioridad:

26.10.2007 GB 0721081

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.09.2017

73 Titular/es:

METCALFE, SUSAN MARIE (50.0%)
10 Fendon Road Cambridge
Cambridgeshire CB1 7RT, GB y
YALE UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

METCALFE, SUSAN MARIE y
FAHMY, TAREK M

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

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

ES 2 634 155 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición inmunomoduladora

5 Campo de la invención

La invención pertenece al campo de las composiciones para modular y controlar la respuesta inmune en un animal, tal como un ser humano como se define en las reivindicaciones. En particular, la invención se refiere a una composición para promover una respuesta de tolerancia inmune en un mamífero, la composición comprende: a) una solución portadora farmacéuticamente aceptable; y b) una pluralidad de nanopartículas biodegradables, en donde las nanopartículas comprenden una capa de polímero biodegradable y donde las nanopartículas comprenden una porción de direccionamiento que es capaz de unirse selectivamente a la superficie de una célula de linfocito T y/o a una célula endotelial vascular, en donde la porción de direccionamiento se selecciona de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno; y en donde las nanopartículas comprenden además un factor inhibidor de la leucemia (LIF). Además se refiere a métodos para controlar la respuesta inmune en un animal o en tejidos y células derivadas de un animal y que se usan en el trasplante de células y tejidos.

Antecedentes

20 Las enfermedades inmunomediadas surgen cuando ocurren errores dentro del sistema inmunológico. Normalmente, la respuesta inmune tiene el potencial de destruir antígenos extraños mientras que al mismo tiempo protege contra el ataque autoinmune. Esta capacidad exquisita para discriminar entre lo "propio" y lo "no propio" es orquestada por los linfocitos T: estas células aseguran que la actividad agresiva destructiva sólo mate dianas extranjeras mientras que la respuesta inmune al huésped ("propio") es activamente protectora y tolerante.

25 Los linfocitos T dominantes tolerantes a antígenos específicos incluyen células T reguladoras (T_{Reg}), que desempeñan un papel importante en la moderación de la respuesta inmune en un organismo para mantener la autotolerancia. Las células que conforman el fenotipo de la T_{Reg} son un grupo de linfocitos T especializados que expresan marcadores de superficie celular incluyendo CD4, CD25, CTLA-4 y GITR. Las células T_{Reg} expresan el factor de transcripción Foxp3. Foxp3 funciona como un represor transcripcional necesario para el desarrollo de linfocitos en el linaje de T_{Reg} y la pérdida de la función Foxp3 típicamente resulta en la muerte temprana en los seres humanos debido a la abrumadora enfermedad autoinmune conocida como IPEX (síndrome de inmunodesregulación poliendocrinopatía enteropatía ligada a X). Las células T_{Reg} se derivan predominantemente del timo, donde se desarrollan bajo un riguroso proceso de selección para asegurar su reactividad autotolerante antes de su liberación en una circulación más amplia. Las células T_{Reg} circulantes contribuyen a la regulación negativa de las respuestas inmunes agresivas del cuerpo contra patógenos extranjeros. Las células T_{Reg} también dominan y suprimen cualquier respuesta inmune agresiva que de otra manera podría conducir al ataque de los propios tejidos del cuerpo (es decir, autotolerancia).

40 La enfermedad puede ocurrir cuando las células T_{Reg} autotolerantes se debilitan, permitiendo de este modo a las células agresivas avanzar. En algunos individuos se desarrollarán enfermedades autoinmunes paralizantes. Se cree que tal actividad inmune inapropiada subyace a un gran número de enfermedades que carecen de terapia curativa incluyendo artritis reumatoide, diabetes mellitus tipo I, lupus eritematoso sistémico (SLE), psoriasis y enfermedad de Crohn por nombrar algunos.

45 La tolerancia inmunológica es también de crucial importancia en el campo del trasplante de órganos. Existe una escasez crítica de órganos donantes y es de primordial preocupación que se realice la tipificación tisular apropiada en el tejido donante y en el receptor antes del trasplante. A pesar de una aparentemente buena compatibilidad entre un huésped receptor y un donante, el sistema inmunológico del receptor reconocerá naturalmente el tejido aloinjertado como "extranjero" y si no se controla rechazará el trasplante. Consecuentemente, los receptores de órganos donados deben permanecer en terapia inmunosupresora durante el resto de sus vidas después del trasplante. Incluso entonces, los receptores están sujetos a un rechazo crónico progresivo dentro de los vasos sanguíneos del órgano trasplantado debido a un proceso insidioso que no es controlado por los fármacos inmunosupresores actuales: tal rechazo vascular crónico finalmente bloquea el flujo sanguíneo dentro del órgano trasplantado causando fallo orgánico. Sin un nuevo trasplante de órganos - poco probable dada la escasez de órganos - o la diálisis en el caso de los receptores de injerto renal, el paciente morirá.

En 2004 alrededor de 15,000 procedimientos de trasplante de riñón se llevaron a cabo sólo en los Estados Unidos, con una tasa de supervivencia al injerto de un año de alrededor del 90 % (datos de OPTN/SRTR a partir del 1 de mayo de 2006). Sin embargo, en la fecha de presentación de esta solicitud más de 70,000 personas estaban en la lista de espera para un trasplante de riñón en los Estados Unidos, lo que demuestra claramente que la demanda supera la oferta muchas veces. Para otros órganos disminuye la tasa de supervivencia del injerto, por ejemplo, la tasa de supervivencia de un año para los trasplantes de hígado fue de alrededor del 83 % y la demanda también es mayor que el suministro disponible de material donante. Aparentemente las altas tasas de supervivencia del injerto a menudo desmienten el hecho de que frecuentemente el trasplante sólo está disponible para individuos con un caso clínico muy favorable. Los pacientes que son considerados como los candidatos más pobres para el trasplante desafortunadamente rara vez se convertirán en receptores de tejidos de donantes tan necesarios.

Existe una necesidad de mejorar el control de la respuesta inmunitaria para promover la tolerancia del huésped al tejido aloinjertado de manera que se incrementa la aceptación del huésped al material trasplantado. Además, la modulación de la respuesta inmunitaria en el receptor de manera que promueva el reconocimiento del tejido trasplantado extraño como "propio" puede servir también para reducir la dependencia del tratamiento inmunosupresor durante toda la vida. Además, los tratamientos inmunomoduladores mejorados también pueden afectar la capacidad de compatibilizar el tejido donante con los receptores que necesitan un trasplante, expandiendo los parámetros para la adaptación del tipo de tejido - es decir, expandiendo los parámetros de tolerancia para la incompatibilidad entre el tipo de tejido del huésped y el del huésped donante. Esto es de importancia primordial para los pacientes con tipos de tejido raro, como los de las minorías étnicas particulares.

La presente invención pretende superar o al menos reducir los problemas que existen proporcionando composiciones y métodos para la modulación dirigida de la respuesta inmune y promoviendo la proliferación y la actividad de células T_{Reg} que suprimirán la respuesta anti donante y/o el proceso de rechazo vascular crónico. No sólo el modo de suministro dirigido aporta inmunomoduladores al sitio donde se necesitan, por ejemplo dentro del trasplante de órganos, sino que también reduce la exposición general del paciente a componentes bioactivos que pueden llevar a efectos secundarios tóxicos a sitios irrelevantes.

Resumen

Las materias en cuestión que no están comprendidas en el alcance de las reivindicaciones no forman parte de la presente invención reivindicada. La invención proporciona una terapia dirigida específicamente al sitio de actividad inmune que está asociado con el estado de enfermedad. La invención también explota un nuevo enfoque molecular para reducir la actividad inmune agresiva aprovechando el propio mecanismo de protección del cuerpo. El beneficio clínico es considerable tanto para pacientes con enfermedad autoinmune como para receptores de injertos de órganos.

Un primer aspecto de la invención proporciona una composición para promover una respuesta de tolerancia inmune en un mamífero, la composición comprende: a) una solución portadora farmacéuticamente aceptable; y b) una pluralidad de nanopartículas biodegradables, en donde las nanopartículas comprenden una capa de polímero biodegradable y en donde las nanopartículas comprenden una porción de direccionamiento que es capaz de unirse selectivamente a la superficie de una célula de linfocito T y/o a una célula endotelial vascular, en donde la porción de direccionamiento se selecciona de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno; y en donde las nanopartículas comprenden además un factor inhibidor de la leucemia (LIF).

Un segundo aspecto de la invención proporciona un método in vitro o ex vivo para inducir que una célula de linfocitos T adopte un fenotipo de T_{Reg} que comprende exponer el linfocito T a una pluralidad de nanopartículas biodegradables, en donde las nanopartículas comprenden una porción de direccionamiento que es capaz de unirse selectivamente a la superficie de una célula de linfocito T y/o a una célula endotelial vascular y en donde las nanopartículas comprenden además un factor inhibidor de la leucemia (LIF).

Un tercer aspecto de la invención proporciona una nanopartícula biodegradable que comprende un material de soporte biodegradable que encapsula un compuesto terapéutico, un compuesto terapéutico y una porción de direccionamiento localizada en la superficie, caracterizado porque el compuesto terapéutico es LIF y la porción de direccionamiento situada en la superficie es un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, que se une específicamente a un antígeno presente en la superficie celular de un linfocito T y/o de una célula endotelial vascular.

Un cuarto aspecto de la invención proporciona el uso de una preparación que comprende una pluralidad de nanopartículas biodegradables, en donde las nanopartículas comprenden una porción de direccionamiento que es capaz de unirse selectivamente a la superficie de una célula de linfocito T y/o de una célula endotelial vascular y en donde las nanopartículas comprenden además un factor inhibidor de leucemia (LIF), en la fabricación de una composición para moderar la respuesta inmune en un paciente. Otros aspectos de la invención proporcionan usos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y enfermedades de injerto contra huésped.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para promover una respuesta de tolerancia inmune en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una pluralidad de nanopartículas biodegradables, en donde las nanopartículas comprenden una porción de direccionamiento que es capaz de unirse selectivamente a la superficie de una célula de linfocito T y/o de una célula endotelial vascular y en donde las nanopartículas comprenden además un factor inhibidor de leucemia (LIF).

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para almacenar tejido de mamífero destinado a aloinjertarse en un receptor que comprende perfundir el tejido con una solución que comprende una pluralidad de nanopartículas biodegradables, en donde las nanopartículas comprenden una porción de direccionamiento que es capaz de unirse selectivamente a la superficie de una célula de linfocito T y/o de una célula endotelial vascular y en donde las nanopartículas comprenden además un factor inhibidor de leucemia (LIF).

Estos y otros aspectos y modalidades de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada de las realizaciones preferidas de la presente invención más abajo.

Dibujos

La Figura 1 muestra una vista esquemática de sección transversal de un linfocito T ilustrativo o de una nanopartícula dirigida a una célula endotelial vascular de la invención.

La Figura 2 (a) muestra los resultados de un experimento en formato de histograma en el que los linfocitos T procedentes de ratones mutantes nulos de axotropina se tratan con LIF y después se ensayan para la liberación de la citoquina proinflamatoria interferón gamma (LIF se muestra en negro, el control se muestra en sombreado). (b) la liberación de interferón gamma es muy alta en el rechazo y es parcialmente inhibida por el LIF. La liberación de interferón gamma en el sobrenadante de cultivos cebados rechazados aumentó con el tiempo, alcanzando 16 ng/ml a los 5 días después del reestímulo con antígeno donante; la presencia de LIF recombinante suprimió esta liberación de interferón gamma alrededor de 50 %. En tolerancia, el interferón gamma nunca excedió 200 pmol, con o sin LIF.

La Figura 3 muestra los resultados de un experimento en el que se activaron células de bazo de ratón genéticamente normales por ligación de CD3/CD28 en presencia o ausencia de LIF exógeno.

La Figura 4 muestra los resultados de un experimento en formato de histograma en el que las células de bazo cebadas de ratones alotolerantes estimulados con antígeno donante (barras negras) *en vivo* muestran niveles incrementados de proteína LIF y niveles disminuidos de proteína IL6 cuando se comparan con células de bazo cebadas de ratones alorechazados estimulados con antígeno donante (barras blancas) *en vivo*, lo que indica que la proteína LIF está vinculado a la alotolerancia y la proteína IL6 está vinculado a alorechazo.

Descripción detallada

La invención proporciona una liberación dirigida mediada por nanopartículas del LIF (factor inhibidor de la leucemia) como un nuevo medio para guiar la tolerogénesis en un paciente. Los inventores demostraron previamente que el LIF es un regulador clave de la respuesta inmune en la que los linfocitos T_{Reg} garantizan colectivamente una tolerancia protectora hacia los tejidos propios mientras que simultáneamente permiten un ataque agresivo contra patógenos extraños. Sin estar ligado a la teoría, se cree que el papel del LIF en este equilibrio crítico está ligado a las células T_{Reg} y actúa de manera concertada con Foxp3. La actividad del LIF sostenida es una característica intrínseca de células T_{Reg}, apoyando la noción de que LIF proporciona una señal para el desarrollo de T_{Reg} y el mantenimiento de T_{Reg}. La presente invención usa nanopartículas cargadas con LIF que están dirigidas específicamente a los linfocitos T para guiar a las células T vírgenes a convertirse en células T_{Reg} antígeno específico mediante la exposición a altas concentraciones locales de actividad LIF. Una ventaja de este enfoque es que tiene aplicación clínica inmediata para receptores de injertos de órganos y también para pacientes que sufren de enfermedad autoinmune.

De acuerdo con la presente invención se considera que la modulación de la tolerancia inmune abarca una supresión del nivel basal inherente de un organismo de la función inmune. Típicamente, el organismo es un animal, más típicamente un mamífero o un ser humano. El nivel basal se toma como el nivel de reactividad inmune en el organismo antes del tratamiento con una composición de la invención. En un individuo sano normal, tal como un paciente humano, el nivel inmunológico sería equivalente al de un nivel de estado estacionario no desafiado. Aunque en un paciente que sufre de un trastorno autoinmune la respuesta inmune basal sería elevada en comparación con un paciente sano normal. Del mismo modo, en un paciente que ha recibido recientemente tejido aloinjertado, se esperaría ver un nivel basal elevado de actividad inmune en ausencia de terapia inmunosupresora tal como ciclosporina. La actividad inmune elevada puede ser identificada por un aumento relativo de los glóbulos blancos asesinos agresivos tales como neutrófilos, macrófagos y células T citotóxicas, así como niveles elevados de citoquinas tales como IL-2, IL-6, IL-13, IL-17, IL-23 y mediadores inflamatorios incluyendo interferón gamma, TNFα e IL1β.

LIF es un miembro de la familia de citoquinas IL-6. Es un factor de señalización secretado que se une a y señala a través de un receptor de superficie celular gp130 específico de LIF que interactúa con el receptor de transducción de señal gp130. La propagación de la señal intracelular aguas abajo se produce a través de la ruta JAK/STAT, especialmente a través del factor de transcripción STAT-3. La actividad de señalización LIF es terminada por SOCS3, SOCS3 que es inducido en un mecanismo de bucle de realimentación. Los presentes inventores han identificado previamente que el tratamiento *ex vivo* de células de bazo murino con LIF aumenta la transcripción de Foxp3. Además, en contraste con un mutante FOXP3 que es incapaz de unirse al ADN y funcionar como un represor transcripcional - FOXP3 de tipo silvestre inhibe fuertemente SOCS-3 (supresor 3 de señalización de citoquinas) (Muthukumarana y otros 2007). Dado que SOCS-3 es un inhibidor de retroalimentación de la señalización del LIF, su represión por FOXP3 de tipo silvestre en las células T_{Reg} tendrá un efecto positivo en la actividad del LIF. Se conoce, además, que en las células T_{Reg} la actividad de señalización del LIF está ligada a la actividad de la ligasa E3 MARCH VII (axotropina) que a su vez regula la actividad de Foxp3. Se prevé un casete regulador jerárquico entre LIF, Foxp3 y axotropina. Dado que Foxp3 es considerado como uno de los marcadores arquetípicos del fenotipo de la T_{Reg}, la regulación de la actividad LIF en las células T_{Reg} y en las células T_{Reg} precursoras pueden tener un efecto profundo sobre la respuesta inmune tolerogénica en un animal.

Las propiedades pleiotróficas del LIF son amplias e incluyen el sistema cardiovascular. La sobreexpresión dirigida del LIF en miocardio infartado previene la pérdida miocárdica y mejora la función cardíaca post infarto en ratas (Berry MF y

otros. J Thorac Cardiovasc Surg. 2004 dic; 128 (6): 866-75). LIF también muestra una capacidad multifacética para el tratamiento de la enfermedad vascular oclusiva, en particular en las primeras etapas de la formación de placa aterosclerótica (Moran CS y otros. Arterioscler Thromb. 1994 agosto; 14 (8): 1356 - 63; World CJ y otros. Ann NY Acad Sci. 2001 dic.; 947: 323-8) y la terapia génica con LIF ha demostrado ser beneficiosa para la supervivencia de aloinjertos de piel en ratones (Akita S. y otros. Trasplante. 2000 oct. 15; 70 (7): 1026-31).

En una modalidad, la presente invención proporciona composiciones que comprenden el LIF que pueden ser dirigidas a una ubicación en una célula, dentro de un tejido o dentro del cuerpo de un paciente o animal. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden comprender LIF biodisponible que se dirige a células que expresan el receptor de superficie celular CD4 (células CD4 +) y, de este modo, incrementan la exposición localizada a LIF para estas células. En otra modalidad de la invención, el LIF puede dirigirse a células que expresan un biomarcador de superficie celular que es característico o se asocia con pluripotencia, tal como el antígeno 1 específico en etapa embrionaria (SSEA-1). Otras moléculas expresadas en la superficie celular que podrían ser objeto de las composiciones de la invención incluyen el receptor de VEGF, EPCR, CD34 y/o CD31 expresado en células endoteliales vasculares para generar un microambiente tolerogénico dentro de un órgano o tejido.

De acuerdo con la invención, las células T que no están conectadas pueden desviarse por el trayecto hasta convertirse en T_{Reg} (autotolerante) mediante la exposición a la señalización del LIF. El LIF no se puede administrar de forma sistémica debido a su citotoxicidad y corta vida media in vivo. La presente invención proporciona un enfoque dirigido al suministro del LIF, que proporciona las ventajas duales de aumentar la concentración local del LIF en el punto de necesidad (es decir, en la superficie celular de la célula T sensible al antígeno) y de reducir la concentración global del LIF que se necesita para obtener el efecto terapéutico deseado. En una modalidad específica de la invención, las nanopartículas que contienen LIF se dirigen a linfocitos T, particularmente a marcadores específicos de linfocitos T situados en la superficie celular. Alternativamente, las nanopartículas que contienen el LIF se dirigen a células endoteliales vasculares. El direccionamiento al marcador de superficie celular especificado se consigue típicamente situando una porción de direccionamiento, tal como anticuerpos, en la superficie de la nanopartícula. Las nanopartículas basadas en polímeros que comprenden porciones de direccionamiento de anticuerpos se describen en WO-A-2006/080951, nanopartículas liposómicas que comprenden porciones de direccionamiento de anticuerpos se describen en WO-A-2005/051305.

Como se usa en la presente descripción, el término anticuerpo denota una proteína que se produce en respuesta a un antígeno que es capaz de combinarse y unirse al antígeno, preferentemente en un sitio específico del antígeno, conocido como epítipo. El término como se usa en la presente descripción incluye anticuerpos de origen policlonal y monoclonal, a menos que se indique lo contrario. Los anticuerpos policlonales son un grupo de anticuerpos producidos por diferentes linfocitos B en respuesta al mismo antígeno; diferentes anticuerpos en el grupo típicamente reconocen diferentes partes (epítopos) sobre el antígeno. Un anticuerpo monoclonal reconoce sólo un tipo de antígeno y es producido por las células hijas de un solo linfocito productor de anticuerpos, típicamente un hibridoma. También se incluyen dentro del término anticuerpo fragmentos de unión a antígenos de anticuerpos naturales o no naturales, por ejemplo, el "fragmento Fab", el "fragmento Fab'" (un Fab con una región de bisagra de cadena pesada) y el "fragmento F(ab')₂" (un dímero de fragmentos Fab' unidos por una región de bisagra de cadena pesada). Se han usado métodos recombinantes para generar pequeños fragmentos de unión al antígeno, tales como "Fv de cadena sencilla" (fragmento variable) o "scFv", que consiste en una cadena ligera de región variable y cadena pesada de región variable unidas por un enlazador peptídico sintético. A diferencia de los anticuerpos derivados de otros mamíferos, las especies de camélidos expresan anticuerpos altamente funcionales y altamente específicos que carecen de secuencias de cadena ligera. Los anticuerpos de cadena pesada de camélidos son de uso particular, ya que se encuentran como homodímeros de una única cadena pesada, dimerizados a través de sus regiones constantes. Los dominios variables de anticuerpos de cadenas pesadas de camélidos se denominan dominios VHH y retienen la capacidad, cuando se aíslan como pequeños fragmentos de la cadena VH, de unirse al antígeno con alta especificidad (Hamers-Casterman y otros, 1993, Nature 363: 446-448; Gahroudi y otros, 1997, FEBS Lett. 414: 521-526). También se incluyen en el término anticuerpo los denominados mutantes camelizados de los dominios VH humanos que retienen la actividad de unión al antígeno pero exhiben algunas de las ventajas de los dominios VHH del camélido (Riechmann, 1994, FEBS Lett. 339: 285-290). Además de los fragmentos de unión al antígeno, los anticuerpos de la presente invención pueden incluir derivados de anticuerpos, tales como fusiones quiméricas con restos marcadores que incluyen la proteína verde fluorescente (GFP).

Pueden usarse porciones diana alternativas que no son anticuerpos para dirigir las nanopartículas de la invención a las células de elección. Por ejemplo, se pueden usar marcadores de afinidad tales como estreptavidina para dirigirse a un objetivo biotinilado. Otros marcadores de afinidad adecuados serán conocidos en la técnica y pueden incluir ligandos anclados para un receptor de superficie celular conocido por expresarse específicamente en la célula diana.

En una modalidad de la invención la composición comprende una nanopartícula basada en polímero biodegradable que comprende un polipéptido LIF encapsulado, cuya nanopartícula comprende además un anticuerpo expuesto a la superficie que se une específicamente, por ejemplo, al receptor CD4. Adecuadamente, el polímero es un polímero de polilactida-co-glicolida (PLG). Las nanopartículas de la invención se resuspenden en una solución biocompatible, tal como solución salina tamponada con fosfato y pueden usarse in vivo (por ejemplo, por administración parenteral), in vitro o ex vivo con el fin de modular la respuesta inmune. Los usos ex vivo pueden incluir pretratamiento del tejido

donante destinado al aloinjerto con las composiciones de la invención poco antes del implante, mejorando de este modo las posibilidades de aceptación del tejido aloinjertado por el receptor. En esta última modalidad de la invención, las nanopartículas pueden comprender una porción de direccionamiento alternativa además de o en lugar del anticuerpo de unión a CD4, por ejemplo un anticuerpo que se dirige a las células endoteliales presentes dentro del tejido de aloinjerto. De esta manera, el LIF puede liberarse de forma controlable desde dentro del tejido aloinjertado en el período inmediatamente después del trasplante, facilitando de este modo la reacción de tolerancia inmunitaria en el receptor.

Las composiciones de la invención son adecuadas para el tratamiento de trastornos autoinmunes. La administración parenteral o subcutánea local de las composiciones que comprenden nanopartículas de la invención en o alrededor de una articulación inflamada puede ayudar a mejorar los síntomas de la artritis reumatoide. Además, la administración tópica de una composición de nanopartículas apropiada (es decir, como una loción o crema para la piel) puede ser eficaz en el tratamiento de la psoriasis. Finalmente, las nanopartículas pueden incorporarse en una formulación de depósito de liberación temporal para uso a largo plazo, adecuada para el tratamiento de encefalopatías autoinmunes y esclerosis múltiple.

Las composiciones de la invención son útiles para el control de la respuesta inmune in vivo, ex vivo o in vitro. En una modalidad específica de la invención, los tejidos y órganos destinados al trasplante (por ejemplo, injertos de corazón, riñón, hueso y vasos sanguíneos) pueden pretratarse con las composiciones de la invención antes de su implantación en el receptor. El tejido de aloinjerto celular, tal como médula ósea o células madre, también puede tratarse in vitro o ex vivo, antes de su introducción en el receptor. Como tal, las composiciones de la invención proporcionan una tecnología facilitadora para la expansión de una variedad de terapias de medicina regenerativa.

En una modalidad particular, las nanopartículas de la invención están comprendidas dentro de la solución de perfusión que se usa para la conservación de órganos y tejidos durante el trasplante de órganos donantes. De esta manera, el LIF comprendido dentro de las nanopartículas tiene un doble propósito de mantener la proliferación de células madre endógenas dentro del tejido de trasplante, así como favorecer la tolerancia inmune en el receptor después de que el procedimiento de trasplante se ha completado.

Ejemplo 1

Los modelos experimentales en ratones han identificado un sistema regulador crítico en linfocitos T en el que *Foxp3* - el gen maestro para la tolerancia reguladora - está regulado en sí mismo por la axotropina/MARCH-7 (una E3-ligasa) y LIF. No sólo la axotropina/MARCH-7 regula directamente la liberación de LIF por los linfocitos T, sino que también se requiere axotropina/MARCH-7 y LIF para la actividad normal del gen *Foxp3*.

En humanos, *Foxp3* y axotropina/MARCH-7 se coexpresan en células sanguíneas periféricas. En pacientes que han recibido un trasplante de médula ósea y también en pacientes que han recibido un trasplante de riñón, la expresión de *Foxp3* y axotropina/MARCH-7 se correlacionan positivamente con una buena función de injerto (Muthukumarany *et al.* 2007). Estos hallazgos deducen que la relación entre tolerancia inmunitaria, axotropina/MARCH-7 y - por extrapolación - LIF es válida en pacientes clínicos y apoya la presente invención que adopta un nuevo enfoque terapéutico tolerogénico de suministro de LIF dirigido al sitio de actividad inmune.

Reciprocidad entre *Foxp3* y LIF

Tabla 1: SOCS-3: magnitud del cambio de 0h a 24h después de la inducción de *Foxp3* en células T humanas

transcrito	FOXP3 tipo silvestre	DE251 FOXP3
SOCS-3	12.00	345.00
LIF	64.00	0.02
FOXP3*	9.00	10.00
*equivalente de ambos transcrito y proteína		

Administración selectiva de fármacos usando nanopartículas

Las nanopartículas poliméricas biodegradables que combinan alta carga de fármacos con direccionamiento a tipos específicos de células han sido desarrolladas por la Universidad de Yale (ver WO-A-2006/080951; y Fahmy y otros 2005). Las nanopartículas cargadas con LIF se prepararon de acuerdo con este protocolo: éstas se recubrieron con avidina para permitir la adición de anticuerpo biotinilado. Los presentes inventores ampliaron el uso de este recurso terapéutico para controlar la respuesta inmunitaria para receptores de trasplante y para pacientes con enfermedad autoinmune.

De acuerdo con la presente invención, se considera que el LIF es un regulador no reconocido previamente de la tolerancia inmune y funciona de acuerdo con Foxp3. En consecuencia, se propone que el tratamiento con LIF dirigido a linfocitos CD4+ guiará a las células T vírgenes hacia el fenotipo tolerante (T_{Reg}).

Diseño experimental:

Basado en datos clínicos, experimentales y moleculares, este ejemplo prueba un nuevo abordaje terapéutico que combina dos estrategias, a saber: (i) entrega dirigida y (ii) aprovechamiento de rutas reguladoras naturales.

La liberación de interferón gamma se reduce en las células inmunitarias expuestas al tratamiento con LIF

La liberación de interferón gamma está fuertemente correlacionada con el rechazo ex vivo, mientras que los autocontroles revelan bajos niveles de interferón gamma. Cuando se estimula por un antígeno de terceros (C57B16), los cultivos tolerantes y rechazados de células de bazo CBA de un modelo de ratón BALB/c tolerante o de rechazo, liberan cada uno niveles altos de interferón gamma pero con una cinética de liberación más lenta en comparación con cultivos cebados, demostrando la especificidad del estado ex vivo alotolerante donde el interferón gamma es bajo. Cuando los cultivos de células libres de suero de estas células se tratan con el LIF, la liberación de interferón gamma en el rechazo cebado se reduce notablemente, reduciéndose a la mitad a partir de los valores de control de alrededor de 9 ng/ml a alrededor de 4 ng/ml (Figura 2 (b)). En las células tolerantes cebadas, los niveles de interferón gamma son muy bajos y en gran medida no responden a la adición de LIF exógeno. La concentración de interferón gamma liberado se determina según ELISA y Western blotting.

El efecto supresor de la señalización del LIF sobre la liberación de interferón gamma se incrementó hasta 90 % de supresión cuando células de bazo vírgenes tomadas de ratones mutantes nulos de axotropina se activaron in vitro mediante reticulación CD3/CD28 (Figura 2 (a)). Esto indica que el tratamiento con el LIF puede conducir a la supresión de la liberación de la citoquina inflamatoria interferón gamma a partir de células inmunes in vitro en determinadas condiciones celulares.

Terapia del LIF usando nanopartículas

Dado que las células T_{Reg} se originan a partir de células T CD4+, las nanopartículas cargadas con el LIF se recubren previamente con anticuerpo anti-CD4 biotinilado (como se muestra en la Figura 1) con el objetivo de dirigir el LIF a los sitios de compromiso del antígeno para la activación de linfocitos CD4+. Las nanopartículas no cargadas actúan como controles mientras que la dosis del LIF administrada se determina por comparación entre los sobrenadantes tratados y control de los experimentos in vitro.

La estrategia tiene el beneficio adicional de que las nanopartículas también pueden ser fagocitadas por las células presentadoras de antígeno, aumentando aún más el suministro del LIF al microambiente del linfocito que responde. En vivo, la absorción de tejido de las nanopartículas de sangre se mide en todos los órganos principales incluyendo pulmón, hígado, riñón, bazo, ganglio linfático, timo, corazón y cerebro. El tamaño de las nanopartículas <500 nm puede reducir el secuestro al hígado: si esto sigue siendo un problema, las nanopartículas "furtivas" se pueden preparar incluyendo polietilenglicol (PEG) biotinilado en la capa superficial.

Medición de Foxp3 por citometría de flujo

Una lectura crítica para los experimentos es la expresión de la proteína Foxp3 en los linfocitos CD4+ (véase la Figura 2). El protocolo de citometría de flujo normalizado emplea seis análisis de color de células individuales en poblaciones complejas: por consiguiente, cada célula se caracteriza por 36 variables potenciales. La tinción superficial incluye CD4, CD3, CD25, CD8, CTLA-4 y gp190 (la subunidad de receptor específica de LIF) mientras que la tinción intracelular mide Foxp3 y CTLA-4 citoplasmática. Las poblaciones de células se fenotipan a 0h y después del cultivo más aloantígeno estimulante en presencia o ausencia de nanopartículas de LIF. De acuerdo con los métodos de la presente invención, la terapia con nanopartículas de LIF conduce a un aumento significativo en el número de células Foxp3+.

Se toman tres enfoques experimentales para validar los resultados aún más.

(i) *Respuesta de linfocitos mixtos*: Un modelo in vitro de aloreactividad es la respuesta unidireccional de linfocitos mixtos (MLR) y los linfocitos de sangre periférica humana se usan en protocolos MLR establecidos para medir tanto la síntesis de ADN por captación de timidina tritiada y expresión de Foxp3 por análisis de citometría de flujo de una sola célula después de la activación en presencia o ausencia de terapia con LIF. Estos experimentos pueden identificar el efecto del LIF durante la preparación del aloantígeno durante un período de 7 días.

(ii) *Respuesta MLR cebada*: El uso de linfocitos aloreactivos cebados plantea hasta qué punto la reactividad inmunitaria cebada específica del donador puede ser guiada hacia el estado tolerante por el tratamiento con LIF. Aquí se usan modelos humanos y murinos. Los experimentos en humanos observan los linfocitos de sangre periférica después de la estimulación con perlas revestidas con antígeno "específicos de donante" comercialmente disponibles, seguidas de

reestimulación con perlas usadas en el paso de cebado, o con perlas de terceros. Estudios *ex vivo* en paralelo usan ratones CBA agrupados en receptores "alotolerantes" versus "alorechazados" de un aloinjerto de corazón BALB/c completamente incompatible: aquí la estimulación de donante-antígeno es a través de células de bazo BALB/c irradiadas usando protocolos estándares. De nuevo se determina si las nanopartículas cargadas con LIF sesgan la respuesta antidonante hacia la tolerancia, buscando aumentos en el número de células Foxp3 positivas durante un período de 7 días. El perfil completo del fenotipo ocurre a tiempo cero, 3, 5 y 7 días para buscar cambios a medida que avanza la aloactivación.

(iii) *Tolerogénesis in vivo mediante terapia con LIF*: Para poder influir en el desarrollo de T_{Reg} *in vivo*, más que en cultivo, representa un reto significativamente mayor, dado que se sabe que el LIF recombinante administrado por vía intravenosa o en el peritoneo se degrada muy rápidamente [Hiltony otros 1991]. Los presentes inventores han desarrollado un nuevo enfoque usando nanopartículas dirigidas que representan un medio potente para lograr la entrega del LIF directamente al microambiente de células T vírgenes, donde la liberación lenta será opcionalmente continua durante varias semanas y el modelo de aloinjerto cardíaco murino es adecuado para probar la eficacia de dicho tratamiento del LIF *in vivo*, típicamente como un preliminar a los estudios preclínicos.

Para probar el efecto del LIF encapsulado en nanopartículas sobre la supervivencia de aloinjertos cardíacos en ratones BALB/c que recibieron un injerto de corazón CBA vascularizado, se ha ideado el siguiente ensayo. Los ratones receptores reciben el LIF encapsulado en nanopartículas dirigidas a CD4 (suministrado por Tarek Fahmy y Jason Park, Universidad de Yale). Los controles históricos no recibieron terapia y rechazaron su injerto alrededor del día 7 después del injerto. La importancia de este experimento es la comprensión de los mecanismos reguladores que controlan las células T *in vivo*.

Materiales y métodos:

Injertos de corazón CBA a BALB/c día 0: N=2

Preparación microencapsulada de LIF:

Pre descargar todas las superficies inertes para eliminar la carga estática
6 mg de nanopartículas en tubo Eppendorf [~ 6 microgramos LIF]
Resuspender en 500 microlitros de PBS estéril
Añadir 100 microlitros de material anti-CD4 biotinilado estéril (eBioscience Cat N 36-0041 (13-0041) 0.5 mg en PBS sin NHN₃: IgG2b de rata, k) @ 1 mg/ml (0.1 mg en total)
Incubar 20 minutos a temperatura ambiente.
Centrifugar a 10,000 g durante 5 minutos
Conservar sobrenadante
Resuspender vigorosamente las nanopartículas mediante sonicación
LAVADO: Añadir lentamente 1 ml de PBS estéril
Centrifugar a 10,000 g durante 5 minutos
Conservar sobrenadante [~ 3 microgramos de LIF (asumiendo una pérdida del 50%)]

Tratamiento de los receptores de aloinjertos:

Resuspender el gránulo de nanopartículas vigorosamente por sonicación
Añadir lentamente - con sonicación - 400 microlitros de PBS estéril
Resuspender vigorosamente por sonicación para administración intravenosa de 200 microlitros POR RATÓN

El tratamiento se lleva a cabo el Día 0; Día 2; Día 4 introduciendo 200 microlitros de nanopartículas del LIF resuspendidas en la vena de la cola usando una aguja de calibre 27 ½.

En el momento del rechazo (cesación del latido del corazón trasplantado) el animal se sacrifica y el corazón donado se retira para su análisis. El corazón nativo también se conserva para el análisis. También se toman muestras de sangre, pulmón, hígado, riñón, piel, timo, ganglio linfático, cerebro, intestino grueso e intestino delgado para determinar la distribución y captación de nanopartículas.

Ratones

La inserción de la trampa genética se usó para generar ratones BALB/c nulos a axotropina y los compañeros de camada de padres heterocigotos fueron genotipados por PCR análisis de ADN genómico para identificar cachorros axot +/+, axot +/- y axot -/- como se detalló anteriormente. El bazo, el timo y el ganglio linfático se obtuvieron a partir de compañeros de camada de 5m de edad y se mantuvieron en hielo antes de la preparación celular para los análisis descritos más abajo. El tejido de los ganglios linfáticos produjo muy pocas células y se descartó

Preparación de células

Se extrajeron esplenocitos y timocitos de cada órgano y se recogieron en medio de crecimiento estéril [RPMI-1640

(Gibco™ Invitrogen Co.) suplementado con FCS al 10% (Gibco™ Invitrogen Co.), L-Glutamina 200 mM, Penicilina 100U/mL y 100 µg/mL Estreptomicina (Sigma Chemical Co.)). Las suspensiones celulares se lavaron, se resuspendieron en medio de crecimiento y se contaron usando un hemocitómetro.

5 ELISA

Los ELISA se realizaron en los sobrenadantes de cultivo de 48 horas, en placas Falcon® de 96 pocillos usando el DuoSet® ELISAS para Interferón gamma (DY485), IL2 (DY402), IL4 (DY404), IL10 (DY417) y Quantikine®M Immunoassay para LIF MLF00), de R&D Systems. Las curvas estándares se establecieron procesando los datos de densidad óptica usando el software Microsoft Excel y se determinaron las concentraciones de citoquina usando las curvas estándares.

Citometría de flujo

Las suspensiones de células esplénicas y tímicas se agotaron y se lavaron en solución de tinción FACS (BSA al 0.2 % y azida sódica al 0.1 % en 1x PBS) antes de mezclarse con los diversos anticuerpos monoclonales detallados más abajo, conjugados directa o indirectamente con Ficoeritrina (PE) o Isotiocianato de Fluoresceína (FITC). El CD19 (557399) anti ratón PE-rata, la cadena TCRα anti ratón PE-hámster (553172) y el clon de célula dendrítica de rata anti ratón 33D1 (551776) procedían de Pharmingen. El CD205-FITC anti-ratón de rata (MCA949F), la cadena pesada IgG2a-FITC (MCA278F) de ratón anti-rata y la cadena IgG2b-FITC anti-rata de ratón fueron de Serotec Ltd. mientras que el CD25 de conejo (IL2Rα) y la IgG anti ratón (H&L)-PE de cabra (4050-89) eran de Santa Cruz Biotechnology y Southern Biotechnology Associates, respectivamente. El anti CD4 (YTS177.9.6) y el anti CD8 (YTS 105.18.10) fueron un regalo del profesor Stephen Cobbold, de la Universidad de Oxford. Los análisis se realizaron en un instrumento Becton Dickinson FACSCalibur equipado con el software CellQuest.

25 Ejemplo 2

Este Ejemplo muestra el efecto de LIF exógeno sobre células T activadas por ligación de CD3/CD8.

Las células de bazo de ratón genéticamente normales cultivadas en medio de crecimiento sin suero fueron activadas por anti-CD3 y anti-CD28 en presencia o ausencia de 10 ng/ml de LIF. Como se muestra en la Figura 3, a las 48 h se descubrió que el LIF exógeno tenía una expresión aumentada de los genes *Nanog*, *p53*, y *LIF* y la disminución de la expresión del gen *SOCS-3*.

Por lo tanto, se predice que la terapia *in vivo* con la administración selectiva de LIF aumentará de forma similar la expresión de los genes *Nanog*, *P53*, y *LIF* en una célula diana y reducirá la expresión de *SOCS-3*.

Ejemplo 3

Este Ejemplo muestra que la proteína del LIF derivada de células está unida a alotolerancia, mientras que la liberación de proteína IL6 está ligada al alorechazo.

Las células de bazo cebadas de ratones alotolerantes o alorechazadas estimuladas *in vivo* por antígeno donador (es decir, células de bazo de tipo donador irradiadas) en medio de crecimiento RPMI que contenía FCS al 10 % reveló que la liberación de proteína LIF derivada de células está unida a alotolerancia, mientras que la liberación de la proteína IL6 está unida al alorechazo (ver Figura 4).

Por lo tanto, se predice que la entrega dirigida de LIF a las células T CD4+ *in vivo* resultará en aumentos en el linaje regulador tolerante (Treg), mientras que la administración dirigida de IL6 se opondrá a la inducción de la tolerancia.

50 Conclusión:

La invención representa un enfoque altamente innovador para el tratamiento de la enfermedad mediada por inmunidad usando el tratamiento de LIF dirigido. Los experimentos incorporan dos grandes avances de importancia central para el tratamiento de las indicaciones mediadas por el sistema inmune, es decir la focalización más el aprovechamiento de una vía natural tolerogénica y de este modo apuntalan el desarrollo de terapias clínicas nuevas y exitosas.

Referencias

Chen, ZK, Cobbold, SP, Waldmann, H. y Metcalfe, SM (1996) Amplification of natural regulatory immune mechanisms for transplantation tolerance. *Transplantation* 62, 1200-1206.

Fahmy T, Samstein RM, Arnés C y Saltzman WM. (2005) Sustained target presentation in biodegradable polymers by surface modification with fatty acid conjugates *Biomaterials*, 26, 5727-36.

Fahmy T (2005) Targeted for drug delivery *Materials Today*, 8, 18-26.

- Hilton DJ, Nicola NA, Waring PM, Metcalf D. Clearance and fate of leukemia-inhibitory factor (LIF) after injection into mice J Cell Physiol. 1991 sep;148(3):430-9
- 5 Hori, S., Nomura, T. y Sakagushi, S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science 299, 1057-1061.
- Metcalf SM, Tracy J. Watson, Sandra Shurey, Elizabeth Adams y Colin J. Green (2005) Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) is linked to regulatory transplantation tolerance Transplantation 79, 726-730
- 10 Muthukumarana, Wook-Jin Chen, Stephen Maher, Bruce R. Rosengard, Alfred LM Bothwell y Su M Metcalfe (2007) Regulatory Transplantation Tolerance and "Stemness": evidence that Foxp3 may play a regulatory role in SOCS-3 gene transcription Transplantation 2007 (en prensa)
- 15 Muthukumarana, GE Lyons y Miura, L Thompson, T Watson, CJ Verde, S Shurey, AD Hess, BR. Rosengard, Su M. Metcalfe. Evidence for functional inter-relationships between FOXP3, leukaemia inhibitory factor, and axotrophin/MARCH-7 in transplantation tolerance International Immunopharmacology 6 (2006) 1993-2001

Reivindicaciones

1. Una composición para promover una respuesta de tolerancia inmunitaria en un mamífero, la composición comprende:
5 a) una solución portadora farmacéuticamente aceptable; y
 b) una pluralidad de nanopartículas biodegradables, en donde las nanopartículas comprenden una capa de polímero biodegradable, en donde las nanopartículas comprenden una porción de direccionamiento que es capaz de unirse selectivamente a la superficie de una célula de linfocito T y/o de una célula endotelial vascular, en donde la porción de direccionamiento se selecciona de un anticuerpo monoclonal, un
10 anticuerpo policlonal o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno; y en donde las nanopartículas comprenden además un factor inhibidor de la leucemia (LIF).
2. La composición de la reivindicación 1, en donde el polímero comprende un polímero de poliláctido-co-glicoluro (PLG).
15
3. La composición de cualquier reivindicación anterior, en donde la porción de direccionamiento se une específicamente al antígeno presente en la superficie de una célula de linfocito T, seleccionado entre uno o más de: un receptor CD4; un receptor CD25; un receptor gp190; y un receptor LIF.
- 20 4. La composición de cualquier reivindicación anterior, en donde la porción de direccionamiento se une específicamente al antígeno presente en la superficie de una célula endotelial vascular, seleccionado de uno o más de: un receptor CD31; un receptor CD34; un receptor de VEGF y un receptor de EPC.
- 25 5. La composición de cualquier reivindicación anterior, en donde las nanopartículas tienen un diámetro entre aproximadamente 50 nm y aproximadamente 500 nm.
6. Un método *in vitro* o *ex vivo* para inducir que una célula de linfocitos T adopte un fenotipo T_{Reg} que comprende exponer el linfocito T a una pluralidad de nanopartículas biodegradables, en donde las nanopartículas comprenden una porción de direccionamiento que es capaz de unirse selectivamente a la superficie de una
30 célula de linfocito T y/o de una célula endotelial vascular, en donde la porción de direccionamiento se selecciona de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno; y en donde las nanopartículas comprenden además un factor inhibidor de la leucemia (LIF).
7. El método de la reivindicación 6, en donde las nanopartículas comprenden una capa de polímero biodegradable que encapsula el LIF.
35
8. El método de la reivindicación 7, en el que el polímero comprende un polímero de poliláctido-co-glicoluro (PLG).
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la porción de direccionamiento se une específicamente al antígeno presente en la superficie de una célula de linfocito T, seleccionada entre: un
40 receptor CD4; un receptor CD25; un receptor gp190; y un receptor LIF.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la porción de direccionamiento se une específicamente al antígeno presente en la superficie de una célula endotelial vascular, seleccionada entre uno o
45 más de: un receptor CD31; un receptor CD34; un receptor de VEGF y un receptor de EPC.
11. Una preparación que comprende una pluralidad de nanopartículas biodegradables, en donde las nanopartículas comprenden además un factor inhibidor de leucemia (LIF) y una porción de direccionamiento que es capaz de unirse selectivamente a la superficie de una célula de linfocito T y/o de una célula endotelial vascular, para el
50 tratamiento de una enfermedad autoinmune, tratamiento de la enfermedad del injerto frente al huésped, o tratamiento de aloinjertos celulares destinados al trasplante.

Figura 1

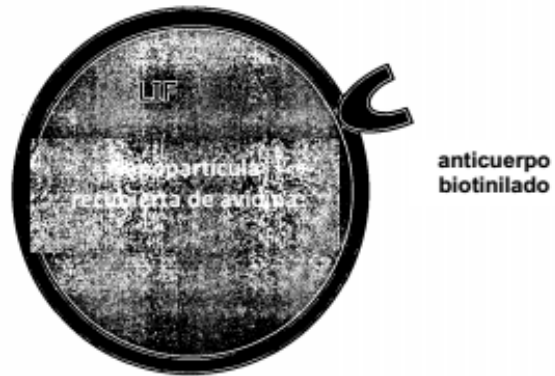


Figura 2 (a)

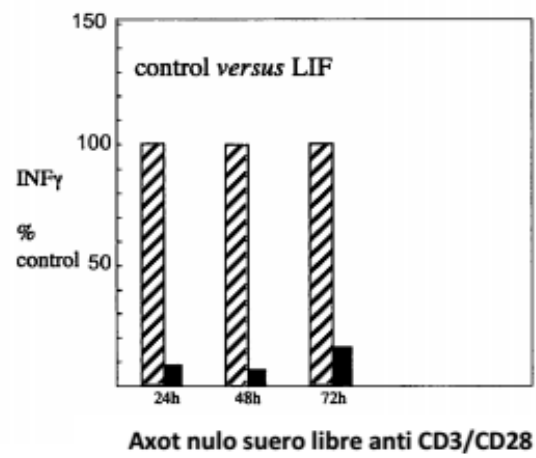


Figura 2 (b)

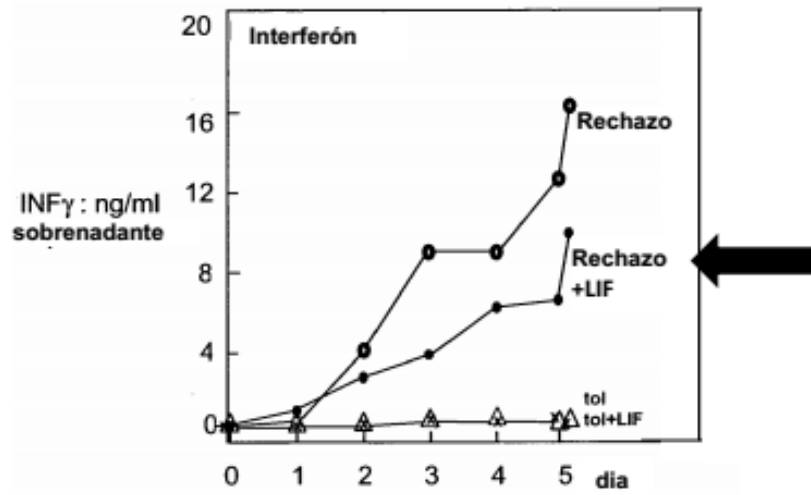


Figura 3

No LIF exógeno		LIF exógeno	
	48h		48h
Genes "A"		Genes "A"	
LIF-R	100%	LIF-R	95%
TGFb	100%	TGFb	100%
STAT3	100%	STAT3	93%
Sirt-1	100%	Sirt-1	76%
Genes "B"		Genes "B"	
Cyclin B2	100%	Cyclin B2	100%
Genes "C"		Genes "C"	
LIF	100%	LIF	130%
NANOG*	100%	NANOG	190%
P53	100%	P53	172%
H-1	100%	H-1	128%
Genes "D"		Genes "D"	
SOCS3	100%	SOCS3	44%
IL6	100%	IL6	109%

Figura 4

