

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 865**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/564 (2006.01)
A61K 47/62 (2007.01)
A61K 47/69 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2011** **PCT/EP2011/066994**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2012** **WO12041968**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2011** **E 11766955 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017** **EP 2621523**

54 Título: **Métodos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes utilizando nanoesferas bioabsorbentes y biocompatibles**

30 Prioridad:

29.09.2010 US 387873 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.11.2017

73 Titular/es:

UTI LIMITED PARTNERSHIP (100.0%)
Suite 130 3553 - 31 Street N.W.
Calgary, AB T2L 2K7, CA

72 Inventor/es:

SANTAMARIA, PEDRO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

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

ES 2 644 865 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

Métodos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes utilizando nanoesferas bioabsorbentes y biocompatibles

Campo de la invención

Esta invención se refiere a composiciones y métodos relacionados con la inmunología y la medicina. En particular, esta invención está relacionada con composiciones para uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, particularmente la diabetes.

Estado de la técnica

La vacunación con antígenos puede usarse para la inducción de la tolerancia de células T en autoinmunidad. La administración de proteínas autoantigénicas o péptidos en disolución puede interrumpir la iniciación y/o progresión de la autoinmunidad en modelos experimentales de las enfermedades autoinmunes (Wraith et al., 1989, Metzler y Wraith, 1993, Liu y Wraith, 1995, Anderton y Wraith, 1998; Karin et al., 1994). Sin embargo, han resultado fallidos casi invariablemente los ensayos clínicos limitados en seres humanos que emplean estrategias similares (Weiner, 1993, Trentham et al, 1993, McKown et al., 1999, Pozzilli et al, 2000, Group, DPT-TDS 2002, Kappos et al, 2000, Bielekova et al, 2000). Esto sugiere que los principios que guían la elección y las condiciones de tratamiento están mal definidos y, en consecuencia, son inadecuados para su aplicación en humanos.

Los trastornos autoinmunes específicos de órganos espontáneos resultan de respuestas complejas contra numerosos epítomos en múltiples antígenos que surgen espontáneamente en una secuencia estocástica y, a menudo, impredecible. Esta complejidad se agrava por el hecho de que los clones de linfocitos que reconocen epítomos idénticos se relacionan con las moléculas del antígeno/complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) dentro de una amplia gama de avididades, cuya intensidad se correlaciona con el potencial patogénico (Amrani et al., 2000; Santamaria, 2001; Liblau et al., 2002). En consecuencia, es probable que el resultado de cualquier estrategia de inmunización para la prevención de la autoinmunidad esté influenciado por la elección del (de los) autoantígeno(s), la dosis, la periodicidad del tratamiento y la vía y forma de administración.

La diabetes tipo 1 (T1D) en ratones se asocia con células T CD8⁺ autoreactivas. Los ratones diabéticos no obesos (NOD) desarrollan una forma de T1D, muy parecida a la T1D humana, que resulta de la destrucción selectiva de células β pancreáticas por células T que reconocen una creciente lista de autoantígenos (Lieberman y DiLorenzo, 2003). Aunque la iniciación de la T1D requiere claramente la contribución de las células CD4⁺, hay pruebas convincentes de que T1D es dependiente de las células T CD8⁺ (Santamaria, 2001; Liblau et al., 2002). Se ha descubierto que una fracción significativa de las células CD8⁺ asociadas a los islotes en ratones NOD utilizan CDR3 -invariante Val7-J α 42⁺ TCR, denominados "tipo 8.3-TCR" (Santamaria et al, 1995; Verdaguer et al, 1996, Verdaguer et al., 1997, DiLorenzo et al, 1998). Estas células, que reconocen el mimotopo NRP-A7 (definido usando bibliotecas de péptidos combinatorias) en el contexto de la molécula MHC K^d (Anderson et al, 1999), son ya un componente significativo del primer islote de NOD CD8⁺ infiltrados (DiLorenzo et al, 1998; Anderson et al., 1999; Amrani et al., 2001), son diabetogénicos (Verdaguer et al, 1996, Verdaguer et al, 1997) y se dirigen a un péptido de la proteína relacionada con la subunidad catalítica de glucosa-6-fosfatasa específica de islote (IGRP) (Lieberman et al., 2003), una proteína de función desconocida (Arden et al, 1999; Martin et al, 2001). Las células CD8⁺ que reconocen este péptido (IGRP₂₀₆₋₂₁₄, similar a NRP-A7) son inusualmente frecuentes en la circulación (> 1/200 células CD8⁺) (Lieberman et al, 2003; Trudeau et al, 2003). En particular, la progresión de la insulinitis a la diabetes en ratones NOD está invariablemente acompañada por la expansión cíclica del grupo CD8⁺ IGRP₂₀₆₋₂₁₄ reactivo en circulación (Trudeau et al, 2003) y por la maduración de la avidéz de su contraparte asociada a islotes (Amrani et al., 2000). Más recientemente, se ha demostrado que las células CD8⁺ asociadas a islotes en ratones NOD reconocen múltiples epítomos IGRP, lo que indica que IGRP es un autoantígeno dominante para las células CD8⁺, al menos en T1D murino (Han et al., 2005). Las células CD8⁺ asociadas a los islotes NOD, particularmente aquellas encontradas al principio del proceso de la enfermedad, también reconocen un epítomo de insulina (Ins B₁₅₋₂₃ (Wong et al, 1999)).

Los estudios de asociación han sugerido que ciertos alelos HLA de clase I (es decir, HLA-A* 0201) proporcionan susceptibilidad a T1D humano (Fennessy et al, 1994, Honeyman et al, 1995, Tait et al., 1995, Nejentsev et al, 1997, Nakanishi et al, 1999, Robles et al, 2002). Los estudios de patología han demostrado que las lesiones de insulitis de los pacientes recién diagnosticados consisten principalmente en células T CD8⁺ (HLA de clase I restringida) (Bottazzo et al, 1985, Atkinson y Maclaren, 1990, Castano y Eisenbarth, 1990, Hanninen et al 1992; Itoh et al., 1993; Somoza et al., 1994; Atkinson y Maclaren, 1994; Morikawi et al., 1999; Imagawa et al., 2001), que son también la población celular predominante en los pacientes tratados por trasplante con isoinjertos de páncreas (de gemelos idénticos) o aloinjertos (de donantes relacionados) (Sibley et al., 1985, Santamaria et al., 1992).

La insulina es un objetivo clave de la respuesta de anticuerpos y CD4⁺ tanto en T1D humano como en murino (Wong et al., 1999, Palmer et al., 1983, Chentoufi y Polychronakos, 2002, Toma et al., 2005, Nakayama et al., 2005, Kent et al., 2005). El epítomo de la cadena B de la insulina humana hInsB₁₀₋₁₈ se presenta por HLA-A* 0201 a las células CD8⁺ autoreactivas tanto en receptores de trasplante de islotes (Pinkse et al., 2005) como en el curso de enfermedades espontáneas (Toma et al. 2005). Además, se han identificado cuatro péptidos adicionales a partir de preproinsulina 1 o 2 de ratón que son reconocidas por células T CD8⁺ asociadas a islotes de ratones transgénicos

HLA-A* 0201 en el contexto de HLA-A* 0201.

IGRP, que está codificado por un gen (localizado en el cromosoma 2q28-32 (Martin et al., 2001)) que se superpone a un locus de susceptibilidad a T1D, IDDM7 (2q31) (Pociot y McDermott, 2002; Owerbach, 2000) ha sido recientemente identificado como un autoantígeno de células beta de relevancia potencial en la T1D humana (Takaki et al., 2006). Dos epítomos de unión a HLA-A*0201 de IGRP humano (hIGRP₂₂₈₋₂₃₆ y hIGRP₂₆₅₋₂₇₃) son reconocidos por células CD8⁺ asociadas a islotes de ratones NOD deficientes en MHC de clase I murina que expresan un transgén HLA-A*0201 (Takaki et al., 2006). En particular, las células T CD8⁺ asociadas a los islotes de estos ratones transgénicos HLA-A*0201 "humanizados" eran citotóxicas para los islotes humanos positivos para HLA-A*0201 (Takaki et al., 2006).

T1D en ratones NOD se puede prevenir mediante la expansión de células CD8⁺ T autoreactivas de baja avidéz. La administración de péptidos solubles (sin adyuvante) es una forma eficaz de inducir tolerancia a células T específicas de antígenos (Aichele et al., 1994; Toes et al., 1996). Previamente, se demostró que el tratamiento de ratones NOD pre-diabéticos con maduración de avidéz difusa NRP-A7 soluble del subgrupo CD8⁺ reactivo con IGRP₂₀₆₋₂₁₄ por la eliminación selectiva de clonotipos que expresan TCR con la afinidad más alta por péptido/MHC (Amrani et al., 2000). Estas observaciones plantearon la posibilidad de que la actividad anti-T1D de NRP-A7 estuviera mediada también fomentando la ocupación del "nicho de clonotipos de alta avidéz" (vaciado por el tratamiento con NRP-A7) por clones de "baja avidéz" (y potencialmente anti-diabetogénicos). Para probar esta hipótesis, se identificaron ligandos peptídicos alterados (APL) con actividad parcial, completa o super agonista para células T CD8⁺ reactivas con IGRP₂₀₆₋₂₁₄ y se comparó su actividad anti-T1D sobre un amplio intervalo de dosis.

El tratamiento crónico con dosis moderadas de APL de afinidad intermedia (NRP-A7) o altas dosis de APL de baja afinidad (NRP-I4) proporcionó la protección T1D. Esto se asoció con una acumulación local de células CD8⁺ reactivas a IGRP₂₀₆₋₂₁₄ de baja avidéz a expensas de sus contrapartidas de alta avidéz, que se suprimieron. Inesperadamente, el tratamiento crónico con altas dosis de un APL de alta afinidad (NRP-V7) o el ligando natural (IGRP₂₀₆₋₂₁₄) sólo proporcionó protección marginal. Sorprendentemente, los islotes de estos ratones casi no contenían células CD8⁺ reactivas a IGRP₂₀₆₋₂₁₄, pero aumentaron las poblaciones de células CD8⁺ que reconocen otros epítomos IGRP. Esto le llevó a los inventores a concluir que la terapia peptídica en la autoinmunidad puede ser más eficaz cuando fomenta la ocupación del nicho de linfocitos de órganos diana por clones no patógenos de baja avidéz (Han et al., 2005), una predicción apoyada por el modelado matemático (Maree et al., 2006). Desafortunadamente, este resultado ocurrió solamente dentro de un intervalo estrecho de dosis de APL y avidéz (para TCRs diana), lo que sugiere que la terapia con péptidos es inadecuada para prevenir o curar la T1D.

Tsai et al., Immunity (2010) 32, 568-680, describen que la progresión a la diabetes autoinmune da como resultado la conversión de células T CD8⁺ autorreactivas de baja avidéz nativas en células autorreguladoras tipo memoria que pueden ser expandidas in vivo con nanopartículas recubiertas con complejos mayores de histocompatibilidad-péptido relevante para la enfermedad (pMHC-NP). Moore et al., Diabetes (2004) 53, 1459-1466, describe un marcador magnético específico de antígeno para reconocer selectivamente a una población prevalente de células T CD8⁺ diabetógenas que contribuye a la progresión de la insulinitis para detectar la diabetes en ratones NOD.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de composiciones adicionales y métodos relacionados para el tratamiento de la diabetes, así como otros trastornos autoinmunes.

Sumario de la invención

Sería difícil tratar a un paciente con péptidos porque, como es el caso del IGRP, esto requeriría varios miligramos de péptidos por dosis. En el presente documento se proporciona la liberación de complejos de antígeno/MHC, por ejemplo, complejos péptido/MHC/nanosferas (sin moléculas coestimuladoras), sobre nanoesferas biocompatibles y bioabsorbibles. Se contempla que estos complejos serán más tolerogénicos que los péptidos solos o los complejos de nanosferas no bioabsorbibles.

Aspectos y realizaciones de esta solicitud incluyen el descubrimiento de un nuevo paradigma en el tratamiento de la autoinmunidad. Tradicionalmente, se han utilizado vacunas para expandir células T capaces de proporcionar protección contra patógenos o el cáncer, o para suprimir células T capaces de causar autoinmunidad. Los aspectos de la presente invención se refieren a un nuevo tipo de "vacuna" que induce selectivamente la expansión de células CD8⁺ autoreactivas con propiedades anti-autoinmunes y, al mismo tiempo, la delección de células CD8⁺ autoreactivas con células patógenas (autoinmunitarias), ambas de acuerdo con la especificidad antigénica de las células T. Las células T CD8⁺ autoreactivas anti-autoinmunes (células CD8⁺ anti-patógenas) suprimen las respuestas de células T autorreactivas en un tejido específico (tras el reclutamiento espontáneo al tejido diana) pero de una manera no específica de antígeno (por ejemplo, supresión local de otras respuestas de células T autorreactivas). Como resultado, el tratamiento con este tipo de vacuna puede prevenir y/o mejorar T1D, así como restaurar la normoglucemia o reducir los niveles de glucosa en ratones NOD hiperglucémicos sin causar inmunosupresión generalizada. Esta estrategia puede ser aplicable al tratamiento de otras enfermedades autoinmunes mediadas por células T y puede ser capaz de prevenir la recurrencia de T1D tras el trasplante de islotes. De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una composición de nanopartículas de alta densidad de partículas que comprende complejos de antígeno-MHC acoplados en una proporción de 0,1:1 a 500:1 a un núcleo de nano esfera

bioabsorbible y biocompatible que tiene un diámetro de 4 nm o de 5 a 15 nm para su uso en un método para prevenir o tratar un trastorno autoinmune cuando se administra a un sujeto. De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición de nanopartículas de alta densidad de partículas que comprende complejos de antígeno-MHC acoplados en una proporción de 0,1:1 a 500:1 a un núcleo de nano esfera bioabsorbible y biocompatible que tiene un diámetro de 4 nm o de 5 a 15 nm para su uso en un método para expandir y/o desarrollar poblaciones de células T autorreactivas anti-patógenas en un sujeto.

Ciertas realizaciones de la presente invención se refieren a métodos para su uso en métodos de reducir o expandir selectivamente células T de acuerdo con la especificidad antigénica de las células T. Por lo tanto, se cree que la presente invención se puede usar para reducir o eliminar células T que reconocen autoantígenos, tales como células T específicas de células P. Como tal, la presente invención se puede usar para prevenir, tratar o mejorar enfermedades autoinmunes tales como IDDM. Además, la presente invención puede usarse para expandir células T deseables, tales como células T que reconocen antígenos tumorales, para prevenir, tratar y/o mejorar enfermedades combatidas por estas células T.

Las realizaciones de la invención están dirigidas a para su uso en métodos para prevenir o tratar un trastorno autoinmunitario que comprende administrar un complejo de nano esfera antígeno/MHC/biocompatible y bioabsorbible a un sujeto en una cantidad suficiente para expandir células T autorreactivas anti-patógenas. Un antígeno incluye, pero no está limitado a, todo o parte de un péptido, ácido nucleico, carbohidrato, lípido u otra molécula o compuesto que pueda modular la actividad de células T o poblaciones de células T, en el contexto de un MHC o un MHC tipo molécula acoplada a un sustrato. La bioabsorbibilidad del complejo de nano esfera es crítica para la invención ya que impide la acumulación a largo plazo de las nanoesferas in vivo con cualquier toxicidad acompañante que surja de ellas.

Las realizaciones de la invención incluyen nanoesferas tolerogénicas que comprenden una nano esfera biocompatible y bioabsorbible acoplada a un complejo antígeno-MHC. El complejo antígeno-MHC puede estar acoplado directamente a dicha nano esfera o a través de un enlazador. Una nano esfera preferida puede comprender además un núcleo de metal biocompatible y bioabsorbible y un revestimiento biodegradable y bioabsorbible. La nano esfera puede comprender además una cubierta o envoltura de otras moléculas que se pueden acoplar fácilmente al complejo antígeno-MHC (por ejemplo, estreptavidina o avidina u otras moléculas conocidas usadas para unir restos a nanoesferas). En ciertos aspectos, una nano esfera biocompatible y bioabsorbible comprende un material seleccionado del grupo que consiste, por ejemplo, en óxido de hierro III, fosfato tricálcico, cromo, galio, así como polímeros bioabsorbibles y biocompatibles tales como PGLA, PLLA, PGA, PDLLA, PCL, PDLGA, PLDLA, PLC (todos los cuales están disponibles en Zeus, 3737 Industrial Blvd, Orangeburg, SC, 29118, EE.UU. bajo el nombre comercial AbsorvTM), ácido hialurónico, alginato, polihidroxialcanoatos y similares. En otros aspectos, una nano esfera bioabsorbible y biocompatible es una nano esfera metálica o magnetizable o superparamagnética. La nano esfera biocompatible y bioabsorbible puede comprender además un revestimiento biodegradable formado a partir de dextrano; polietilenglicol; poli(óxido de etileno); manitol; poli(hidroxalcanoato)s de la clase PHB-PHV; y otros poli(sacáridos) modificados tales como almidón, celulosa y quitosano.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un complejo de nanoesferas bioabsorbibles y biocompatibles de epítipo auto-antígeno-MHC que comprende un núcleo biocompatible y un revestimiento biodegradable y bioabsorbible sobre la superficie externa de dicho núcleo y complejos de antígeno-MHC de alta densidad acoplados a una relación de 0,1:1 a 500:1 a una nano esfera bioabsorbible biocompatible que tiene un diámetro de 4 nm o de 5 a 15 nm.

Algunos aspectos de la invención incluyen métodos y composiciones que se refieren a composiciones antigénicas que incluyen segmentos, fragmentos o epítopos de polipéptidos, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y otras moléculas que provocan o inducen una respuesta antigénica o inmune, generalmente denominados antígenos. En aspectos particulares, el antígeno se deriva, es un mimico, o es un antígeno autoreactivo y/o complejos de los mismos.

Los antígenos peptídicos incluyen, pero no se limitan a, hInsB₁₀₋₁₈ (HLVEALYLV (SEQ ID NO: 1)), hIGRP₂₂₈₋₂₃₆ (LNIDLLWSV (SEQ ID NO: 2)), hIGRP₂₆₅₋₂₇₃ (VLFGLGFAI) (SEQ ID NO: 3)), IGRP₂₀₆₋₂₁₄ (VYLKTNVFL (SEQ ID NO:4)), NRP-A7 (KYNKANAFI (SEQ ID NO:6)), NRP-14 (KYNIANVFL (SEQ ID NO:7)), NRP-V7 (KYNKANVFL (SEQ ID NO:8)), YAI/D^b (FQDENLYL (SEQ ID NO:9)) y/o INS B₁₅₋₂₃ (LYLVCGERG (SEQ ID NO:10)), así como péptidos y proteínas descritos en la Publicación de EE.UU. 20050202032.

En ciertos aspectos, un antígeno peptídico para el tratamiento de T1D es GAD65₁₁₄₋₁₂₃, VMNILLQYV (SEQ ID NO:14); GAD65₅₃₆₋₅₄₅, RMMEYGTMMV (SEQ ID NO:15); GFAP₁₄₃₋₁₅₁, NLAQTDLATV (SEQ ID NO:16); GFAP₂₁₄₋₂₂₂, QLARQQVHV (SEQ ID NO:17); IA-2₁₇₂₋₁₈₀, SLSPLQAEI (SEQ ID NO:18); IA-2₄₈₂₋₄₉₀, SLAAGVKLL (SEQ ID NO:19); IA-2₈₀₅₋₈₁₃, VIVMLTPLV (SEQ ID NO:20); pplAPP₅₋₁₃, KLQVFLIVL (SEQ ID NO:21); pplAPP₉₋₁₇, FLIVLSVAL (SEQ ID NO:22); IGRP₁₅₂₋₁₆₀, FLWSVFMIL (SEQ ID NO:23); IGRP₂₁₁₋₂₁₉, NLFLFLFAV (SEQ ID NO:24); IGRP₂₁₅₋₂₂₃, FLFAVGfYL (SEQ ID NO:25); IGRP₂₂₂₋₂₃₀, YLLLRVLNI (SEQ ID NO:26); IGRP₂₂₈₋₂₃₆, LNIDLLWSV (SEQ ID NO:2); IGRP₂₆₅₋₂₇₃, VLFGLGFAI (SEQ ID NO:3); IGRP₂₉₃₋₃₀₁, RLLCALTSI (SEQ ID NO:27); Pro-insulina_{L2-10}, ALWMRLPL (SEQ ID NO:28); Pro-insulina_{L3-11}, LWMRLPLL (SEQ ID NO:29); Proinsulina_{L6-14}, RLLPLLALL (SEQ ID NO:30); Pro-insulina_{B5-14}, HLCGSHLVEA (SEQ ID NO:31); Pro-insulina_{B10-18}, HLVEALYLV (SEQ ID NO:1); Pro-insulina_{B14-22},

ALYLVCGER (SEQ ID NO:32); Pro-insulina_{B15-24}, LYLVCGERGF (SEQ ID NO:33); Pro-insulina_{B17-25}, LVCGERGFF (SEQ ID NO:34); Pro-insulina_{B18-27}, VCGERGFYF (SEQ ID NO:35); Pro-insulina_{B20-27}, GERGFYF (SEQ ID NO:36); Pro-insulina_{B21-29}, ERGFYTPK (SEQ ID NO:37); Pro-insulina_{B25-C1}, FYTPKTRRE (SEQ ID NO:38); Pro-insulina_{B27-C5}, TPKTRREAEDL (SEQ ID NO:39); Proinsulina_{C20-28}, SLQPLALEG (SEQ ID NO:40); Pro-insulina_{C25-33}, ALEGLQKR (SEQ ID NO:41); Pro-insulina_{C29-A5}, SLQKRGIVEQ (SEQ ID NO:42); Pro-insulina_{A1-10}, GIVEQCCTSI (SEQ ID NO:43); Pro-insulina_{A2-10}, IVEQCCTSI (SEQ ID NO:44); Pro-insulina_{A12-20}, SLYQLENYC (SEQ ID NO:45) o combinaciones de los mismos.

En aún otros aspectos, pueden usarse antígenos peptídicos asociados con la esclerosis múltiple (EM) e incluyen: MAG₂₈₇₋₂₉₅, SLLLEEEV (SEQ ID NO:46); MAG₅₀₉₋₅₁₇, LMWAKIGPV (SEQ ID NO:47); MAG₅₅₆₋₅₆₄, VLFSSDFRI (SEQ ID NO:48); MBPI₁₁₀₋₁₁₈, SLSRFSWGA (SEQ ID NO:49); MOG₁₁₄₋₁₂₂, KVEDPFYWV (SEQ ID NO:50); MOG₁₆₆₋₁₇₅, RTFDPHFLRV (SEQ ID NO:51); MOG₁₇₂₋₁₈₀, FLRVPCWKI (SEQ ID NO:52); MOG₁₇₉₋₁₈₈, KITLFVIVPV (SEQ ID NO:53); MOG₁₈₈₋₁₉₆, VLGPLVALI (SEQ ID NO:54); MOG₁₈₁₋₁₈₉, TLFVIVPVL (SEQ ID NO:55); MOG₂₀₅₋₂₁₄, RLAGQFLEEL (SEQ ID NO:56); PLP₈₀₋₈₈, FLYGALLA (SEQ ID NO:57) o combinaciones de los mismos.

En ciertos aspectos, el complejo antígeno-MHC puede reticularse (conjugarse) a las nanoesferas descritas en la presente memoria. Un método no limitativo de conjugación de una nanosfera con un complejo antígeno-MHC incluye (a) hacer reaccionar un complejo antígeno-MHC con un agente de conjugación, formando de este modo un complejo antígeno-MHC; y (b) hacer reaccionar una nano esfera biocompatible y biodegradable con el complejo de la etapa (a). En una realización, el método comprende concentrar el complejo de la etapa (a) antes de realizar la etapa (b). En otra realización, el agente de conjugación comprende un agente heterobifuncional. En otra realización más, el agente de conjugación comprende DOTA-maleimida (4-maleimidobutiramidobencil-DOTA), SMPT (4-succinimidiloxycarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno-), sulfo-LC-SMPT (sulfosuccinimidil-6-(α -metil- α -(2-piridilditio)toluamido)hexanoato, reactivo de Traut (2-iminotiolano-HCl), o cualquier combinación de los mismos. Véase la Publicación de Patente U.S. 20070059775; Pat. de EE.UU. Nos. 4.671.958, 4.659.839, 4.414.148, 4.699.784; 4.680.338; 4.569.789; 4.589.071; 7.186.814 y 5543391 de la solicitud de patente europea n° 188.256 para una descripción de los complejos de conjugación a micropartículas o nanopartículas.

Un trastorno autoinmune puede incluir, pero no está limitado a, diabetes melitus, rechazo de trasplante, esclerosis múltiple, fallo ovárico prematuro, esclerodermia, enfermedad de Sjogren, lupus, vireo, alopecia (calvicie), fallo poliglandular, enfermedad de Grave, hipotiroidismo, polimiositis, pénfigo, enfermedad de Crohn, colitis, hepatitis autoinmune, hipopituitarismo, miocarditis, enfermedad de Addison, enfermedades cutáneas autoinmunes, uveítis, anemia perniciosa, hipoparatiroidismo y/o artritis reumatoide. En ciertos aspectos, un componente peptídico de un complejo antígeno/MHC/nanosfera se deriva o diseña a partir de un autoantígeno o un epítipo de autoantígeno, o un imitador del mismo, implicado en la respuesta autoinmune a ser sondado, modulado o amortiguado por el tratamiento. En aspectos particulares, el autoantígeno es un péptido, carbohidrato o lípido. En ciertos aspectos, un autoantígeno es un fragmento, epítipo o péptido de una proteína, carbohidrato o lípido expresado por ciertas células de un sujeto, tales como células beta pancreáticas, e incluye, pero no se limita a un fragmento de IGRP, insulina, GAD o proteína IA - 2. Varias de tales proteínas o epítipos han sido identificados para una variedad de condiciones autoinmunes. El autoantígeno puede ser un péptido, carbohidrato, lípido o similar derivado de un segundo componente endocrino o neurocrino, tal como una célula de Schwann peri-islote o similar.

En aún otros aspectos de esta invención, el componente MHC del complejo antígeno/MHC/nanosfera es un componente polipeptídico MHC clase I o MHC clase II, clásico o no clásico. El componente MHC de clase I puede comprender todo o parte de una molécula de HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, particularmente todo o parte de una molécula HLA-A, tal como una molécula de HLA-A*0201 MHC de clase I. El componente MHC clase I no clásico puede comprender moléculas tipo CD1. Un componente de MHC clase II puede comprender todo o parte de un HLA-DR, HLA-DQ o HLA-DP. En ciertos aspectos, el complejo antígeno/MHC está covalentemente o no covalentemente acoplado o unido a un sustrato (complejo antígeno/MHC/nanosfera). El sustrato es típicamente una nano esfera absorbible y biocompatible. En una realización, la nano esfera comprende un metal, tal como hierro u óxido de hierro. En otra realización, la nano esfera comprende un polímero biocompatible y bioabsorbible. En cualquier caso, la nanosfera experimenta bioabsorción in vivo, de manera que la acumulación de las nanopartículas in vivo es limitada. Los péptidos de la invención se pueden acoplar químicamente a un sustrato y en particular acoplarse a través de un enlace químico o peptídico. Las moléculas CD1 son un ejemplo de una molécula MHC no clásica. Las moléculas MHC no clásicas se caracterizan como no polimórficas, conservadas entre las especies y que poseen bolsas de unión al ligando estrechas, profundas e hidrófobas. Estas bolsas de unión son capaces de presentar glicolípidos y fosfolípidos frente a células T Natural Killer (NKT). Las células NKT representan una población única de linfocitos que coexpresan los marcadores de células NK y un receptor de células T semi-invariantes (TCR). Están implicados en la regulación de las respuestas inmunes asociadas con una amplia gama de enfermedades.

En ciertas realizaciones, las células T expandidas por el tratamiento han sido preactivadas por el proceso de enfermedad y tienen un fenotipo de memoria. En un aspecto, las células T surgen de precursores autorreactivos que reconocen el epítipo diana con baja avidez. La avidez puede determinarse mediante un ensayo de unión a un tetrámero o similar. En otro aspecto, el complejo antígeno/MHC/nano esfera se administra antes, después o tanto antes como después de la aparición de los síntomas clínicos de la enfermedad autoinmune de interés. En aún otro aspecto más, el método puede incluir una etapa que comprende evaluar un parámetro biológico de una condición

autoinmune, tal como los niveles de azúcar en sangre del sujeto antes y/o después del tratamiento. Los métodos de la invención también pueden incluir la evaluación del estado autoinmune de un sujeto, incluyendo la evaluación de cualquier respuesta inmune autorreactiva. En ciertos aspectos, una célula T es una célula T CD4⁺ o CD8⁺ o una célula NK T (NKT).

- 5 Otras realizaciones de la invención incluyen composiciones para su uso en métodos para expandir células T autorreactivas anti-patógenas que comprenden administrar un complejo antígeno/MHC/nanosfera en una cantidad suficiente para estimular la expansión de una célula T autorreactiva anti-patogénica. En ciertos aspectos, la célula T es una célula T CD8⁺ o CD4⁺ o una célula NKT.

- 10 También se describen métodos para proteger las células de un sujeto, tales como las células de un islote pancreático, a partir de una respuesta autoinmune, particularmente una respuesta autoinmune patogénica, que comprende administrar a un sujeto un complejo antígeno/MHC/nanosfera en una cantidad suficiente para inhibir la destrucción de las células o tejidos que comprenden las células, en donde el antígeno o la molécula antigénica de la que se deriva es de un autoantígeno asociado con células.

- 15 También se describen métodos para diagnosticar autoinmunidad que comprenden evaluar la expansión inducida por tratamiento de respuestas de células T anti-patógenas CD8⁺ o CD4⁺ como una indicación de la autoinmunidad activa.

- 20 Las realizaciones de la invención pueden incluir composiciones para su uso en métodos para prevenir, mejorar o tratar el rechazo de tejidos trasplantados por respuestas alogénicas o autoinmunes administrando un complejo antígeno/MHC acoplado operativamente a un sustrato (es decir, un complejo antígeno/MHC/nanosfera) a un sujeto en una cantidad suficiente para expandir células T autorreactivas anti-patógenas o inducir la expansión de células antipatógenas que reconocen aloantígenos o autoantígenos expresados por tejidos u órganos trasplantados.

- 25 También se describen métodos para aumentar o mantener el número de células funcionales, por ejemplo, células de islote, de un tipo predeterminado en un mamífero mediante la prevención o inhibición de la muerte o eliminación celular. Este método se usa para tratar una enfermedad autoinmune en la que se desea una regeneración endógena de células y/o tejidos. Tales enfermedades autoinmunes incluyen, sin limitación, diabetes melitus, esclerosis múltiple, insuficiencia ovárica prematura, esclerodermia, enfermedad de Sjogren, lupus, vitelego, alopecia (calvicie), fallo poliglandular, enfermedad de Grave, hipotiroidismo, polimiositis, pénfigo, enfermedad de Crohn, colitis, hepatitis autoinmune, hipopituitarismo, miocarditis, enfermedad de Addison, enfermedades de la piel autoinmunes, uveítis, anemia perniciosa, hipoparatiroidismo, artritis reumatoide y similares. Un aspecto de la invención
30 proporciona un nuevo enfoque terapéutico en dos partes para ablacionar la autoinmunidad existente mientras se vuelve a preparar el sistema inmune.

- En ciertos aspectos, el complejo antígeno/MHC/nanosfera no necesita administrarse con un adyuvante para inducir una respuesta inmune, por ejemplo, una respuesta de anticuerpo. En realizaciones particulares, la composición de antígeno/MHC/nano esfera puede usarse junto con técnicas de anticuerpos policlonales y monoclonales bien
35 conocidas para producir un anticuerpo usando un adyuvante o varios reducidos o ningún adyuvante.

Descripción de los dibujos

- Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en la
40 presente memoria.

Figs. 1A - 1C. Las células T auto-reactivas 17.6 α /8.3 β CD8⁺ de baja afinidad son anti-diabetogénicas. La Fig. 1A, Frecuencia de diabetes en ratones 17.6 α /8.3 β -NOD (n = 95) versus 17.4 α /8.3 β -NOD (n = 598). La Fig. 1B, puntuación de Insulitis en ratones Tg (n = 6 para 17.6 α /8.3 β -NOD, n = 3 para 17.4 α /8.3 β -NOD). La Fig. 1C, Frecuencia de diabetes en NOD (n = 56) versus LCMV-NOD (n = 10).

- 45 Figs. 2A - 2B. Biología del desarrollo del TCR 17.6 α /8.3 β . La figura 2A, Biología del desarrollo de 17.6 α /8.3 β frente a 17.4 α /8.3 β TCR en ratones Tg. Los paneles superiores son representativos de los diagramas de puntos de CD4 frente a CD8 de esplenocitos. El panel inferior es la comparación de la tinción de células T CD8⁺ con el tetrámero NRP-V7/K^d. Fig. 2B, Biología del desarrollo de los TCR de 17.6 α /8.3 β frente a 17.4 α /8.3 β en ratones RAG-2^{-/-} Tg. Los paneles superiores son representativos de los diagramas de puntos de CD4 frente a CD8 de esplenocitos. El panel inferior es la comparación de tinción de células T CD8⁺ con el tetrámero NRP-V7/K^d.
50

Fig. 3. Frecuencia de la diabetes en ratones 17.6 α /8.3 β -NOD.RAG-2^{-/-} (n = 13) versus 17.4 α /8.3 β -NOD.RAG-2^{-/-} (n = 106).

- 55 Figs. 4A - 4B. Biología del desarrollo de 17.6 α /8.3 β versus 17.4 α /8.3 β TCR en ratones TCR α ^{-/-} Tg. Fig. 4 A, los paneles superiores son representativos de los diagramas de puntos de CD4 frente a CD8 de esplenocitos. El panel inferior es la comparación de la tinción de células T CD8⁺ con el tetrámero NRP-V7/K^d. Fig. 4B, Frecuencia de diabetes en ratones 17.6 α /8.3 β -NOD.TCR α ^{-/-} (n = 14) frente a 17.4 α /8.3 β -NOD.TCR α ^{-/-} (n = 28). Los valores en los

paneles FACS del diagrama de puntos corresponden a los porcentajes de las células dentro de cada cuadrante y los valores en los paneles de histograma corresponden a los porcentajes de las células que se tiñeron positivas (media $\pm$ SE).

Figs. 5A - 5J. Las células T CD8⁺ 17.6 α /8.3 β se diferencian espontáneamente en células T de memoria con función reguladora. Fig. 5A, Perfiles FACS representativos de células T CD8⁺ esplénicas de ratones 17.6 α /8.3 β -NOD.TCR α -/- frente a 17.4 α /8.3 β -NOD.TCR α -/-. Fig. 5B, Porcentaje de células T CD44^{hi} CD122⁺ CD8⁺ dentro del bazo (n = 12 para 17.6 α /8.3 β -NOD.TCR α -/- y n = 9 para 17.4 α /8.3 β -NOD.TCR α -/-), PLN (n = 9 para 17.6 α /8.3 β -NOD.TCR α -/- y n = 6 para 17.4 α /8.3 β -NOD.TCR α -/-) y BM (n = 4 para 17.6 α /8.3 β -NOD.TCR α -/- y n = 3 para 17.4 α /8.3 β -NOD.TCR α -/-) de ratones TCR α -/- Tg (media $\pm$ SE). Los ratones tenían entre 9 y 18 semanas de edad. Fig. 5C, Perfil FACS representativo de células T CD8⁺ esplénicas de ratones 17.6 α /8.3 β -NOD.TCR α -/- teñidos con tetrámero NRP-V7/K^d frente a anticuerpo anti-CD 122. Los valores son la media $\pm$ SE de cinco experimentos diferentes. Fig. 5D, Análisis fenotípico de linfocitos T CD8⁺ esplénicos nativos frente a memoria de los ratones 17.6 α /8.3 β -NOD.TCR α -/-. Los datos son representativos de al menos dos experimentos para cada marcador. Fig. 5E, Comparación de la tinción de CD122 en timocitos CD8⁺ CD4⁻ versus esplenocitos CD8⁺ de ratones TCR α -/- Tg. Los datos son representativos de cuatro experimentos. Fig. 5F, Captación de BrdU por células T CD8⁺ esplénicas de ratones TCR α -/- Tg. Fig. 5G, Panel superior: perfil FACS representativo de la proliferación de células T CD8⁺ esplénicas de ratones Tg en respuesta a citoquinas IL-2 e IL-15 (ambas a 100 ng/ml). Panel inferior: Expansión doble de células T CD8⁺ nativas vs. memoria de ratones 17.6 α /8.3 β -NOD.TCR α -/- en respuesta a diferentes concentraciones de IL-2 e IL-15. Los datos son representativos de al menos tres experimentos. Fig. 5H, Producción de IFN- γ por células T CD8⁺ nativas esplénicas de ratones 17.4 α /8.3 β -NOD.TCR α -/- frente a linfocitos T CD8⁺ nativos y de memoria de ratones 17.6 α /8.3 β -NOD.TCR α -/- en respuesta a los DC pulsados con 1 μ g/ml de NRP-A7 después de 24 y 48 horas. Fig. 5I, Tinción intracelular de IFN- γ a partir de células T CD8⁺ nativas esplénicas de ratones 17.4 α /8.3 β -NOD.TCR α -/- frente a linfocitos T CD8⁺ nativos y de memoria de 17.6 α /8.3 β -NOD.TCR α -/- en respuesta a los DC pulsados con 1 μ g/ml de NRP-A7 después de 6 horas. Fig. 5J, Producción de IL-2 y proliferación en respuesta a los DC pulsados con 1 μ g/ml de NRP-A7 en diferentes puntos temporales. Los datos en la FIG. 5H y la FIG. 5J son representativos de cuatro experimentos y los datos de la FIG. 5I son representativos de tres experimentos.

Fig. 6. Proliferación de células T CD8⁺ 17.4 α /8.3 β marcadas con CFSE. Proliferación de células T CD8⁺ 17.4 α /8.3 β marcadas con CFSE en respuesta a DCs pulsadas con NRP-A7 en presencia de células T CD8⁺ nativas frente a de memoria de 17.6 α /8.3 β -NOD.TCR α -/- ratones (panel superior) o células T CD8⁺ nativas de 17.4 α /8.3 β -NOD frente a ratones LCMV-NOD (panel inferior). Los datos son representativos de al menos cinco experimentos.

Fig. 7A - 7B. Las células T CD8⁺ de memoria 17.6 α /8.3 β matan las APCs pulsadas con antígeno. Figura 7A, Citotoxicidad in vitro de células T CD8⁺ nativas recién aisladas de ratones 17.4 α /8.3 β -NOD.TCR α frente a linfocitos T CD8⁺ nativos y de memoria de ratones 17.6 α /8.3 β -NOD.TCR α -/- contra DCs BM NRP-A7 y TUM pulsados. Los datos son representativos de tres experimentos. Los DC de BM purificados se pulsaron con 1 μ g/ml de NRP-A7 o TUM y se marcaron con cromato de sodio [⁵¹Cr].

Relación Efector:diana = 8:1 (40000 efectores: 5000 células diana). Se recogió el sobrenadante después de 8 horas. Fig. 7B, Ensayo de citotoxicidad in vivo: se inyectaron células DC LN (paneles inferiores) y pulsadas con NRP-A7 (CFSE^{lo}) o pulsadas con TUM (CFSE^{hi}) (paneles superiores) o esplénicas recién aisladas en huéspedes Tg a razón de 1:1. Se aislaron células B o DC frescas (de bazo y LNs) utilizando perlas de MACS anti-B220 o anti-CD11c, se pulsaron con 10 μ g/ml de péptidos durante 2 horas, se lavaron, se marcaron con CFSE (TUM: 3 μ M CFSE, NRP - A7: 0,3 μ M CFSE) durante 3 minutos a 37°C, se lavaron 3 veces y se inyectaron en los huéspedes 4 - 5x10⁶ células de cada población. Después de 18 horas se sacrificaron los ratones y se analizaron los esplenocitos FACS.

La Figura 8 representa una imagen ampliada de nanosferas de PLGA conjugadas con pMHC (poli(D,L-lactida-co-glicolido)).

La Figura 9 representa las respuestas de IFN γ por células T CD8⁺ a complejos de nanosfera IGRP/Kd-PLGA en la concentración de nanopartículas/pocillo indicada.

Descripción detallada de la invención

Debe entenderse que esta invención no está limitada a realizaciones particulares descritas, ya que, por supuesto, pueden variar. También se debe entender que la terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir únicamente realizaciones particulares y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Debe tenerse en cuenta que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un excipiente" incluye una pluralidad de excipientes.

I. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende cualquier experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

Como se usan en este documento, los siguientes términos tienen los siguientes significados.

- Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "que comprende" o el término "comprende" significa que las composiciones y métodos incluyen los elementos citados, sin excluir a otros. "Consiste esencialmente en", cuando se usa para definir composiciones y métodos, significa excluir otros elementos de cualquier significado esencial a la combinación para el propósito declarado. Por lo tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se definen en el presente documento no excluiría otros materiales o etapas que no afecten materialmente a las características básicas y nuevas de la invención reivindicada. "Consistir en" significa excluir más que los oligoelementos de otros ingredientes y los pasos sustanciales del método. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.
- Por "biocompatible" se entiende que los componentes del sistema de liberación no causarán lesión tisular o lesión al sistema biológico humano. Para impartir biocompatibilidad, se utilizarán preferentemente los polímeros y excipientes que han mostrado antecedentes de uso seguro en seres humanos o con el estado GRAS (Generalmente Aceptado como Seguro). Por biocompatibilidad se entiende que los ingredientes y excipientes usados en la composición serán finalmente "bioabsorbidos" o eliminados por el cuerpo sin efectos adversos para el cuerpo. Para que una composición sea biocompatible y se considere no tóxica, no debe causar toxicidad a las células. De forma similar, el término "bioabsorbible" se refiere a nanopartículas hechas de materiales que se someten a bioabsorción in vivo durante un periodo de tiempo tal que se evita la acumulación a largo plazo del material en el paciente. En una realización preferida, la nanopartícula biocompatible es bioabsorbida durante un periodo de menos de 2 años, preferiblemente menos de 1 año e incluso más preferiblemente menos de 6 meses. La tasa de bioabsorción está relacionada con el tamaño de la partícula, el material utilizado y otros factores bien reconocidos por los expertos en la técnica. Puede usarse una mezcla de materiales biocompatibles y bioabsorbibles para formar las nanoesferas usadas en esta invención. En una realización, se pueden combinar óxido de hierro (III) y un polímero biocompatible y bioabsorbible. Por ejemplo, el óxido de hierro (III) y PGLA pueden combinarse para formar una nanopartícula.
- Un complejo antígeno/MHC/nanosfera se refiere a la presentación de un péptido, carbohidrato, lípido u otro segmento antigénico, fragmento o epítipo de un antígeno molécula o proteína (es decir, auto péptido o autoantígeno) sobre una superficie, tal como una nano esfera biocompatible y biodegradable. "Antígeno", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a todo, parte, un fragmento o segmento de una molécula que puede inducir una respuesta inmune en un sujeto o una expansión de células antipatogénicas.
- El término "aproximadamente", cuando se usa antes de una designación numérica, por ejemplo, temperatura, tiempo, cantidad y concentración, incluyendo un intervalo, indica aproximaciones que pueden variar de (+) o (-) 10%, 5% o 1%.
- Por "matar" o "mata" se pretende causar la muerte celular por apoptosis o necrosis. La apoptosis o la necrosis pueden estar mediadas por cualquier ruta de muerte celular.
- Las "células autoinmunes" incluyen, por ejemplo, esplenocitos adultos, linfocitos T, linfocitos B y células de origen de médula ósea, tales como células presentadoras de antígeno defectuosas de un mamífero, que tienen actividad hacia el organismo del que deriva la célula autoinmune.
- Un "mímico" es un análogo de un ligando o péptido dado, en el que el análogo es sustancialmente similar al ligando. "Sustancialmente similar" significa que el análogo tiene un perfil de unión similar al ligando excepto que el mímico tiene uno o más grupos funcionales o modificaciones que representan colectivamente menos de aproximadamente 50%, menos de aproximadamente 40%, menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 10%, o menos de aproximadamente 5% del peso molecular del ligando.
- Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para lograr el propósito pretendido, por ejemplo, la modulación de la actividad de las células T o de las poblaciones de células T. Como se describe en la presente memoria en detalle, la cantidad eficaz, o dosificación, depende del propósito y del antígeno y puede determinarse de acuerdo con la presente descripción.
- Una "célula T auto-reactiva" es una célula T que reconoce un "auto-antígeno", que es una molécula producida y contenida por el mismo individuo que contiene la célula T. Una célula T autorreactiva puede ser una célula T CD8⁺ o una célula T CD4⁺. Además, la célula T CD4⁺ puede clasificarse como una célula TR1 (T Regulatoria 1).
- Una "célula T patogénica" es una célula T que es perjudicial para un sujeto que contiene la célula T. Mientras que una célula T no patogénica no es sustancialmente perjudicial para un sujeto, y una célula T anti-patógena reduce, mejora, inhibe o niega el daño de una célula T patógena.
- Los términos "inhibición", "reducción" o "prevención", o cualquier variación de estos términos, cuando se usan en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva, incluye cualquier disminución medible o inhibición completa para conseguir el resultado deseado.
- El uso de la palabra "un" o "uno/a", cuando se usa junto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar "uno", pero también es consistente con el significado de "uno o más", "al menos

uno" y "uno o más de uno".

El término "anti-patógeno" se refiere a células que tienen un efecto protector contra la causa de la enfermedad. Por ejemplo, "células T CD8⁺ autoreactivas anti-patógenas" se refiere a células que tienen un efecto protector contra TID. "Células T CD8⁺ anti-patógenas autoreactivas" también se refiere a células que tienen un efecto protector contra otras enfermedades autoinmunes tales como las enumeradas en la subsección V titulada: Dianas diagnósticas y terapéuticas.

Por "nanosfera" se entiende en este documento pequeñas partículas discretas que son administrables a un sujeto. En ciertas realizaciones, las nanoesferas tienen forma sustancialmente esférica. La expresión "sustancialmente esférico", tal como se utiliza en este documento, significa que la forma de las partículas no se desvía de una esfera en más de aproximadamente un 10%. Pueden aplicarse a las partículas varios complejos de antígeno o péptido conocidos de la invención. Las nanoesferas de esta invención varían en tamaño desde aproximadamente 10 nm hasta aproximadamente 150 μ l y, preferiblemente, desde aproximadamente 10 nm hasta aproximadamente 1 μ m. Pueden obtenerse partículas de nano-tamaño más pequeñas, por ejemplo, por fraccionamiento, con lo que las partículas mayores se dejan sedimentar en una solución acuosa. La porción superior de la solución se recupera entonces. Esta porción superior está enriquecida en partículas de menor tamaño. El proceso se puede repetir hasta que se genere un tamaño medio deseado.

A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar de error para el dispositivo o método que se emplea para determinar el valor.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se utiliza para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que sólo se refieren a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la descripción apoya una definición que se refiere sólo a alternativas y "y/o".

Como se usa en este documento y en las reivindicaciones, los términos "anticuerpo" o "inmunoglobulina" se usan indistintamente y se refieren a cualquiera de las diversas clases de proteínas estructuralmente relacionadas que funcionan como parte de la respuesta inmune de un animal o receptor, proteínas que incluyen IgG, IgD, IgE, IgA, IgM y proteínas relacionadas.

Como se usa en este documento, las expresiones "agente inmunogénico" o "inmunógeno" o "antígeno" se usan indistintamente para describir una molécula capaz de inducir una respuesta inmunológica contra sí misma en la administración a un receptor, ya sea solo, en conjunción con un adyuvante, o presentado en un vehículo de visualización.

Como se usa en la presente memoria, una "molécula de amino" se refiere a cualquier aminoácido, derivado de aminoácido o imitador de aminoácidos conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, los residuos de la molécula proteínica son secuenciales, sin que ninguna ninguna molécula no amino interrumpa la secuencia de los residuos de moléculas de amino. En otras realizaciones, la secuencia puede comprender uno o más restos de moléculas no amino. En realizaciones particulares, la secuencia de residuos de la molécula proteínica puede estar interrumpida por uno o más restos de molécula no amino.

Por consiguiente, la expresión "composición proteínica" abarca secuencias de moléculas de amino que comprenden al menos uno de los 20 aminoácidos comunes en proteínas naturalmente sintetizadas, o al menos un aminoácido modificado o inusual.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tratamiento" o "tratar" significa cualquier tratamiento de una enfermedad o condición en un paciente, incluyendo:

- prevenir o proteger contra la enfermedad o condición, es decir, hacer que los síntomas clínicos no se desarrollen, por ejemplo, en un sujeto en riesgo de sufrir de tal enfermedad o condición, evitando así sustancialmente el inicio de la enfermedad o condición;

- inhibir la enfermedad o condición, es decir, detener o suprimir el desarrollo de los síntomas clínicos; y/o

- aliviar la enfermedad o condición, es decir, causar la regresión de los síntomas clínicos.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Las observaciones hasta la fecha (Han et al., 2005) sugirieron que, para ser eficaces en autoinmunidad, la terapia peptídica tendría que dirigirse a múltiples especificidades de epítipo. Los péptidos solubles pueden inducir la tolerancia péptido-específica de las células T, pero no pueden mitigar las respuestas auto-inmunes poli-específicas. Los inventores razonaron que sería muy poco práctico realizar esto con péptidos porque, en el caso del IGRP solo, esto requeriría varios miligramos de péptidos por dosis. Debido a que los péptidos son mucho más tolerogénicos (es decir, en cantidades menores) cuando se unen a moléculas de MHC en APCs fijas (Miller et al., 1979), se contempló que la administración sistémica de complejos de antígeno/MHC, por ejemplo complejos péptido/MHC (sin moléculas

coestimulantes) en las nanoesferas podría ser más tolerogénica que los péptidos solos. Este pensamiento evolucionó a partir de la disponibilidad de un reactivo inicialmente concebido para imitar la inflamación de los islotes. Los inventores trataron de proporcionar específicamente una sonda susceptible de visualización por resonancia magnética (RM) a células T CD8⁺ tipo 8,3 circulantes (nanoesferas de óxido de hierro revestidas con complejos NRP-V7/K^d) (Moore et al. 2004). En particular, los inventores contemplaron revestir estas nanoesferas con varios complejos antígeno/MHC diferentes como una manera de inducir la delección simultánea de múltiples especificidades de células T por debajo del umbral requerido para el desarrollo de T1D. Más sorprendentemente, se encontró que los complejos de pMHC se unieron a una partícula de soporte sólido por expansión, de una manera específica de epítipo, de células CD8⁺ autoreactivas experimentadas por autoanticuerpos que suprimen el reclutamiento de otras especificidades autoantigénicas. Esta avenida terapéutica explota un nuevo paradigma en la progresión de las respuestas autoinmunes crónicas que permite el diseño racional de «nanovacunas» específicas de enfermedades capaces de atenuar la autoinmunidad sin perjudicar la inmunidad sistémica, una meta muy buscada en la terapia de estos trastornos. De acuerdo con el paradigma anterior, cualquier especificidad de epítipo único (pMHC) implicado en la enfermedad (entre cientos) se puede usar, cuando se recubre como un ligando en NPs, para contener las respuestas autoinmunes complejas. El componente de partícula/soporte sólido es esencial, porque los pMHCs solubles multiméricos no pueden inducir el tipo de respuestas inmunes inducidas por sus contrapartes acopladas a NP. La partícula permite una multimerización superior de pMHC y proporciona a estas pMHC potentes propiedades de reticulación del receptor. Por lo tanto, este paradigma y el enfoque terapéutico que permitió su descubrimiento proporcionan una plataforma para una nueva clase de terapéutica en la autoinmunidad.

Se contempla que las nanoesferas revestidas con complejos antígeno/MHC (complejo antígeno/MHC/nanosfera) ampliará el tipo de células CD8⁺ anti-patógenas autorreactivas de baja avidéz que proporcionan protección contra T1D en ratones tratados con APL (Han et al, 2005; Maree et al, 2006). También se contempla que estas nanoesferas expandirán los depósitos preexistentes de células T CD8⁺ autorreactivas de memoria (es decir, no inducir células de memoria T de novo). Se cree que estas agrupaciones pre-existentes están predominantemente (si no exclusivamente) compuestas de clonótipos CD8⁺ autoreactivos de baja avidéz (anti-patógenos). Las contrapartes de alta avidéz de estas células T (con actividad patológica) no sobreviven in vivo como células de memoria, posiblemente, pero no limitan la invención a ninguna teoría en particular, porque sufren una muerte celular inducida por la activación tras una exposición crónica a su autoantígeno de células beta diana endógeno. Se cree que estas nanoesferas no tienen que tener como objetivo una población predominante de células T CD8⁺ autoreactivas para ser eficaces: se obtuvieron resultados similares con nanoesferas revestidas con un complejo de péptido subdominante/MHC. Además, se cree que esta tecnología no requiere el diseño de APL de avidéz definida (a diferencia del caso con péptidos), y por lo tanto tiene el potencial para acomodar cualquier antígeno diana o diana de péptido/MHC. Se contempla que esta tecnología reestablecerá la normoglucemia en ratones NOD con T1D recién diagnosticada, a tasas que son al menos comparables, si no mejores, que las obtenidas con el tratamiento con mAb anti-CD3, un enfoque no específico de antígeno que ha mostrado alguna promesa en ensayos clínicos (Herold et al, 2002; Keymeulen et al, 2005).

Se cree que las composiciones de la invención se pueden usar para expandir conjuntos preexistentes de células T CD8⁺ autoreactivas de memoria (es decir, no parecen ser capaces de inducir células T de memoria de novo). Estas agrupaciones preexistentes están predominantemente (si no exclusivamente) compuestas de clonótipos CD8⁺ autoreactivos de baja avidéz (anti-patógenos). Las contrapartes de alta avidéz de estas células T (con actividad patológica) no sobreviven in vivo como células de memoria y existen predominantemente como células T nativas. Se contempla además que las células T nativas sufren de muerte celular al acoplar complejos autoantígeno/MHC/nanosfera en ausencia de coestimulación y, por lo tanto, la invención puede tanto eliminar células T patógenas inocuas como expandir células T de memoria anti-diabetogénicas. Las composiciones descritas no necesitan dirigirse a una población prevalente de células T CD8⁺ autoreactivas para que sean eficaces. En ciertas realizaciones, las composiciones y métodos pueden usarse para inducir la tolerancia de células T autorreactivas.

Se contempla que las nanoesferas bioabsorbibles y biodegradables presentarán resultados sorprendentes e inesperados en comparación con los complejos pMHC/antígeno recubiertos sobre un soporte sólido no biodegradable y no bioabsorbible. Estos resultados inesperados incluyen una menor toxicidad. La menor toxicidad puede referirse a una reducción en la acumulación de la nanosfera en los órganos y/o tejidos en todo el cuerpo. La menor toxicidad también puede referirse a una disminución en la respuesta biológica no deseada, tal como una disminución de la inflamación o una disminución del daño tisular de los órganos en todo el cuerpo. La inflamación y el daño tisular son evaluaciones que pueden ser determinadas fácilmente por el experto en la técnica mediante métodos conocidos. También se contempla que las nanoesferas biodegradables y bioabsorbibles serán más toleradas por el cuerpo. Esto puede conducir a una reducción de la dosis terapéutica o a un aumento o una respuesta terapéutica más eficaz. La respuesta terapéutica en cuanto se refiere a la autoinmunidad se puede determinar mediante los ensayos descritos en los Ejemplos.

En una realización de la invención, el material biodegradable y bioabsorbible es elegido por el médico experto basándose en la semivida in vivo pronosticada de la nano esfera. La semivida es una que se puede determinar fácilmente basándose en las propiedades físicas de la nano esfera, tales como el material utilizado y el tamaño de la nano esfera. En una realización preferida, la velocidad de degradación corresponde al intervalo de tiempo que el médico determina que es uno en el que se alcanza el efecto terapéutico máximo. Por lo tanto, se contempla que las nanoesferas biodegradables y bioabsorbibles tendrán un potencial terapéutico mejorado y superior debido a la

selección de un material que se degradará dentro de un marco de tiempo predicho y tendrá los efectos secundarios menos adversos.

II. Composiciones farmacéuticas y administración

La presente invención incluye composiciones para su uso en métodos para prevenir o mejorar una condición autorreactiva. Como tal, la invención contempla "vacunas" o modificadores del sistema inmune para su uso en diversas realizaciones. Las composiciones propuestas que son adecuadas para su uso como vacuna pueden prepararse a partir de moléculas autorreactivas que incluyen proteínas autoreactivas y sus fragmentos. La invención incluye composiciones que pueden usarse para inducir o modificar una respuesta inmune contra un antígeno autorreactivo, por ejemplo, un polipéptido, un péptido, un carbohidrato, un lípido u otra molécula o fragmento molecular y contra el desarrollo de una condición o enfermedad causada por tal respuesta autoinmune.

Las composiciones de la invención se pueden administrar normalmente por vía parenteral, por inyección, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular. Otras formulaciones que son adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales. Las formulaciones orales incluyen tales excipientes normalmente empleados como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones se presentan en forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen de aproximadamente 10% a aproximadamente 95% de ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente 25% a aproximadamente 70%.

Típicamente, las composiciones de la invención se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad tal que es terapéuticamente eficaz y modificante inmune. La cantidad a administrar depende del sujeto a tratar. Las cantidades precisas de ingrediente activo que se requiere administrar dependen del juicio del médico. Sin embargo, intervalos de dosificación adecuados son del orden de diez a varios cientos de nanogramos o microgramos del complejo de antígeno/MHC/nanosfera por administración. Los regímenes adecuados para la administración inicial y los refuerzos también son variables, pero se caracterizan por una administración inicial seguida por administraciones posteriores.

La forma de aplicación puede variar ampliamente. Se pueden aplicar cualquiera de los métodos convencionales para la administración de una vacuna. Se cree que estos incluyen la aplicación oral sobre una base sólida fisiológicamente aceptable o en una dispersión fisiológicamente aceptable, parenteralmente, por inyección y similares. La dosificación del complejo antígeno/MHC/nanosfera dependerá de la vía de administración y variará según el tamaño y la salud del sujeto.

En muchos casos, será deseable tener múltiples administraciones de un complejo péptido/MHC/nanosfera, de aproximadamente, como máximo aproximadamente, o al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más. Las administraciones oscilarán normalmente entre 2 días y 12 semanas, más usualmente entre una y dos semanas. Los refuerzos periódicos a intervalos de 0,5 a 5 años, usualmente dos años, serán deseables para mantener la condición del sistema inmunológico. El curso de las administraciones puede ser seguido por ensayos para detectar respuestas inmunes autorreactivas y la actividad de las células T.

A. Terapia combinada

Las composiciones y métodos relacionados de la presente invención, particularmente la administración de un complejo antígeno/MHC/nanosfera, también pueden usarse en combinación con la administración de terapias tradicionales. Estos incluyen, pero no se limitan a, la administración de terapias o tratamientos inmunosupresores o moduladores.

En un aspecto, se contempla que se use un complejo antígeno/MHC/nano esfera junto con un tratamiento de citoquinas. Alternativamente, la administración del complejo antígeno/MHC/nanosfera puede preceder o seguir al otro tratamiento mediante intervalos que van desde minutos a semanas. En realizaciones en las que los otros agentes y/o complejos de antígeno/MHC/nanosfera se administran por separado, se garantiza generalmente que no acabaría un período de tiempo significativo entre el tiempo de cada suministro, de tal manera que el agente y el complejo antígeno/MHC/nanosfera podría todavía ejercer un efecto ventajosamente combinado sobre el sujeto. En tales casos, se contempla que se pueden administrar ambas modalidades en aproximadamente 12 - 24 h entre sí y, más preferiblemente, en aproximadamente 6 - 12 h entre sí. En algunas situaciones, puede ser deseable extender el período de tiempo para la administración significativamente, sin embargo, cuando pasan de varios días (2, 3, 4, 5, 6 ó 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas.

Pueden emplearse diversas combinaciones, por ejemplo, la administración del complejo antígeno/MHC/nanosfera es "A" y el agente adicional es "B":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A/ BB/A/A

B/AB/A B/A/AB A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

- 5 La administración de las composiciones del complejo de péptido-MHC de la presente invención a un paciente/sujeto seguirán protocolos generales para la administración de tales compuestos, teniendo en cuenta la toxicidad, si la hay. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. También se contempla que se pueden aplicar varias terapias estándar, tales como la hidratación, en combinación con la terapia descrita.

B. Composiciones farmacéuticas

- 10 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto. Diferentes aspectos de la presente invención implican administrar una cantidad eficaz de una composición del complejo de antígeno/MHC/nanosfera a un sujeto. Adicionalmente, dichas composiciones pueden administrarse en combinación con modificadores del sistema inmune. Dichas composiciones generalmente se disolverán o dispersarán en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

- 15 Las frases "farmacéuticamente aceptables" o "farmacológicamente aceptables" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administran a un animal o ser humano. Tal como se utiliza en la presente memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o
20 agente convencional sea incompatible con los ingredientes activos, se contempla su uso en composiciones inmunogénicas y terapéuticas.

- 25 Los compuestos activos de la presente invención pueden formularse para la administración parenteral, por ejemplo, ser formulados para la inyección a través de las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea o incluso intraperitoneal. La preparación de una composición acuosa que contiene un complejo antígeno/MHC/nanosfera que modifica la condición inmune del sujeto será conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Típicamente, tales composiciones se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para usar para preparar soluciones o suspensiones después de la adición de un líquido antes de la inyección; y las preparaciones también pueden emulsionarse.

- 30 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que pueda ser fácilmente inyectada. También debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de
35 microorganismos, tales como bacterias y hongos.

- Las composiciones se pueden formular en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

- 40 El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y poli(etilenglicol) líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión, y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser provocada por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada por el uso en las composiciones de agentes retardadores de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

- 45 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por la esterilización. La esterilización de la solución se realizará de tal manera que no disminuya las propiedades antipatogénicas del péptido/MHC/nanosfera. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos
50 ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado al vacío y

lío-filización, que proporcionan un polvo del ingrediente activo, más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada del mismo. Uno de estos métodos de esterilización de la solución es la filtración estéril, sin embargo, esta invención pretende incluir cualquier método de esterilización que no disminuya significativamente las propiedades antipatogénicas de los complejos péptido/MHC/nanosfera. Los métodos de esterilización que implican calor y presión intensos, tales como el autoclavado, pueden comprometer la estructura terciaria del complejo, disminuyendo así significativamente las propiedades antipatogénicas de los complejos péptido/MHC/nanosfera.

La administración de las composiciones de acuerdo con la presente invención será típicamente vía cualquier ruta común. Esto incluye, pero no se limita a, ortotópica, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intranasal o intravenosa. En ciertas realizaciones, se puede inhalar una composición de vacuna (por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.651.655).

Se determina una cantidad eficaz de la composición terapéutica o profiláctica basada en el objetivo pretendido. La expresión "dosis unitaria" o el término "dosis" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para su uso en un sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de la composición calculada para producir las respuestas deseadas discutidas anteriormente en asociación con su administración, es decir, la ruta apropiada y el régimen. La cantidad a administrar, tanto en función del número de tratamientos como de la dosis unitaria, depende del resultado y/o la protección deseada. Cantidades precisas de la composición también dependen del juicio del médico y son peculiares a cada individuo. Entre los factores que afectan la dosis se incluyen el estado físico y clínico del sujeto, la vía de administración, el objetivo del tratamiento (alivio de los síntomas frente al curado) y la potencia, estabilidad y toxicidad de la composición particular. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal como es terapéuticamente o profilácticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente.

C. Administración in vitro o ex vivo

Como se usa en el presente documento, la expresión administración in vitro se refiere a manipulaciones realizadas sobre células extraídas de un sujeto o de fuera de éste, incluyendo, pero sin limitarse a, células en cultivo. La expresión administración ex vivo se refiere a células que han sido manipuladas in vitro, y que se administran posteriormente a un sujeto. La expresión administración in vivo incluye a todas las manipulaciones realizadas dentro de un sujeto, incluidas las administraciones.

En ciertos aspectos de la presente invención, las composiciones pueden administrarse in vitro, ex vivo o in vivo. En ciertas realizaciones in vitro, las células T autólogas se incuban con las composiciones de esta invención. Las células pueden usarse entonces para su análisis in vitro, o alternativamente para la administración ex vivo.

III. Complejos del MHC

Los antígenos, incluyendo los segmentos, fragmentos y otras moléculas derivadas de una especie antigénica, incluyendo, pero sin limitarse a, péptidos, carbohidratos, lípidos u otras moléculas presentadas por moléculas de MHC clásicas y no clásicas de la invención son típicamente complejadas u operativamente acopladas a una molécula de MHC o derivado del mismo. El reconocimiento del antígeno por los linfocitos T es el complejo principal de histocompatibilidad (MHC)-restringido. Un linfocito T dado reconocerá un antígeno sólo cuando esté unido a una molécula MHC particular. En general, los linfocitos T se estimulan sólo en presencia de moléculas MHC propias, y el antígeno se reconoce como fragmentos del antígeno unido a moléculas MHC propias. La restricción de MHC define la especificidad de los linfocitos T en términos del antígeno reconocido y en términos de la molécula de MHC que se une a su(s) fragmento(s) antigénico(s). En aspectos particulares, ciertos antígenos se emparejarán con ciertas moléculas de MHC o polipéptidos derivados de la misma.

La expresión "acoplado operativamente" o "recubierto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una situación en la que se combinan componentes polipéptidos individuales (por ejemplo, MHC) y antigénicos (p. ej. péptidos) para formar el complejo activo antes de unirse al sitio diana, ejemplo, una célula inmune. Esto incluye la situación en la que los componentes del complejo polipéptido individual se sintetizan o se expresan de forma recombinante y posteriormente se aíslan y combinan para formar un complejo, in vitro, antes de la administración a un sujeto; la situación en la que un polipéptido quimérico o de fusión (es decir, cada componente de proteína discreta del complejo está contenido en una única cadena polipeptídica) se sintetiza o se expresa de forma recombinante como un complejo intacto. Típicamente, se añaden complejos polipeptídicos a las nanoesferas para dar nanoesferas con complejos de polipéptidos adsorbidos o acoplados que tienen una relación de número de moléculas: número de relaciones de nanoesferas de aproximadamente, al menos aproximadamente o como máximo de aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 10, 100, 500, 1000 o más a :1, más típicamente 0,1:1 a 50:1. El contenido de polipéptidos de las nanoesferas se puede determinar usando técnicas estándar.

A. Moléculas de MHC

Los antígenos intracelulares y extracelulares presentan desafíos muy diferentes al sistema inmune, tanto en términos de reconocimiento como de respuesta apropiada. La presentación de antígenos a células T está mediada

por dos clases distintas de moléculas MHC de clase I (MHC-I) y MHC de clase II (MHC-II), que utilizan distintas vías de procesamiento de antígenos. Los péptidos derivados de los antígenos intracelulares se presentan a las células T CD8⁺ por moléculas MHC de clase I, que se expresan prácticamente en todas las células, mientras que los péptidos extracelulares derivados del antígeno se presentan a las células T CD4⁺ mediante moléculas MHC-II. Sin embargo, hay ciertas excepciones a esta dicotomía. Varios estudios han demostrado que los péptidos generados a partir de partículas endocitadas o proteínas solubles se presentan en moléculas MHC-I en macrófagos así como en células dendríticas. En ciertas realizaciones de la invención, un péptido particular derivado de un autoantígeno se identifica y se presenta en el complejo péptido/MHC/nanosfera en el contexto de un polipéptido MHC de clase I o II apropiado. En ciertos aspectos, la composición genética de un sujeto puede evaluarse para determinar qué polipéptido MHC se va a usar para un paciente particular y un conjunto particular de péptidos.

También se contemplan moléculas MHC no clásicas para su uso en complejos MHC de la invención. Las moléculas MHC no clásicas no son polimórficas, se conservan entre las especies y poseen bolsas de unión al ligando estrechas, profundas e hidrófobas. Estas bolsas de unión son capaces de presentar glicolípidos y fosfolípidos a células T Natural Killer (NKT). Las células NKT representan una población única de linfocitos que coexpresan los marcadores de células NK y un receptor de células T semi-invariantes (TCR). Están implicados en la regulación de las respuestas inmunes asociadas con una amplia gama de enfermedades.

B. Componentes antigénicos

Algunos aspectos de la invención incluyen métodos y composiciones que se refieren a composiciones antigénicas que incluyen segmentos, fragmentos o epítopos de polipéptidos, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y otras moléculas que provocan o inducen una respuesta antigénica, generalmente denominados antígenos. En particular, se pueden identificar y utilizar los autoantígenos, o segmentos antigénicos o fragmentos de tales autoantígenos, que conducen a la destrucción de una célula a través de una respuesta autoinmune, y se utilizan en la preparación de un complejo MHC/nano esfera descrito en la presente memoria. Dichos autoantígenos pueden presentarse en islotes pancreáticos o en células de islotes pancreáticos que soportan células. Las realizaciones de la invención incluyen composiciones y métodos para la modulación de una respuesta inmune contra una célula particular o conjunto de células que llevan a cabo una función fisiológica particular.

1. Componentes peptídicos y composiciones proteínicas

Los polipéptidos y péptidos de la invención pueden ser modificados por varias delecciones, inserciones y/o sustituciones de aminoácidos. En realizaciones particulares, los polipéptidos y/o péptidos modificados son capaces de modular una respuesta inmune en un sujeto. Como se usa en la presente memoria, una "proteína" o un "polipéptido" o "péptido" se refiere a una molécula que comprende al menos cinco residuos de aminoácidos. En algunas realizaciones, se emplea una versión de tipo natural de una proteína o péptido, sin embargo, en muchas realizaciones de la invención, se emplea una proteína o polipéptido modificado para generar un complejo péptido/MHC/nanosfera. Un complejo péptido/MHC/nanosfera puede usarse para generar una respuesta inmune y/o para modificar la población de células T del sistema inmune (es decir, reeducar el sistema inmune). Los términos descritos anteriormente se pueden usar indistintamente en la presente memoria. Una "proteína modificada" o "polipéptido modificado" o "péptido modificado" se refiere a una proteína o polipéptido cuya estructura química, particularmente su secuencia de aminoácidos, está alterada con respecto a la proteína o polipéptido de tipo natural. En algunas realizaciones, una proteína o polipéptido modificado o péptido tiene al menos una actividad o función modificada (reconociendo que las proteínas o polipéptidos o péptidos pueden tener múltiples actividades o funciones). Se contempla específicamente que una proteína o polipéptido modificado o péptido puede ser alterado con respecto a una actividad o función, pero conserva una actividad o función de tipo natural en otros aspectos, tal como la inmunogenicidad o la capacidad de interactuar con otras células del sistema inmunitario cuando estén en el contexto de un complejo MHC/nanosfera.

Los péptidos de la invención incluyen cualquier péptido autorreactivo. Los péptidos autoreactivos incluyen, pero no se limitan a, hInsB₁₀₋₁₈ (HLVEALYLV (SEQ ID NO: 1)), hIGRP₂₂₈₋₂₃₆ (LNIDLLWSV) (SEQ ID NO: 2)), hIGRP₂₆₅₋₂₇₃ (VLFGGLGFAI (SEQ ID NO: 3)), IGRP₂₀₆₋₂₁₄ (VYLKTNVFL (SEQ ID NO: 4)), hIGRP₂₀₆₋₂₁₄ (VYLKTNLFL (SEQ ID NO: 5)), NRP-A7 (KYNKANAFI (SEQ ID NO: 6)), NRP-I4 (KYNIANVFL (SEQ ID NO: 7)), NRP-V7 (KYNKANVFL (SEQ ID NO: 8)), YAI/D^b (FQDENLYLV (SEQ ID NO: 9)) y/o INS B₁₅₋₂₃ (LYLVCGERG (SEQ ID NO: 10)), así como los péptidos y proteínas descritas en la publicación de EE.UU. 20050202032. Otros péptidos que se pueden usar junto con la invención como péptidos autorreactivos o como péptidos de control incluyen, pero no se limitan a, INS-I9 (LYLVCGERI (SEQ ID NO: 11)), TUM (KYQAVTTTL (SEQ ID NO: 12)), y G6Pasa (KYCLITIFL (SEQ ID NO: 13)). En ciertos aspectos, se pueden usar 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más péptidos. Ejemplos de péptidos que se pueden usar junto con la presente invención también incluyen los proporcionados en la Tabla 1. Estos péptidos pueden estar asociados con nano esfera/moléculas de MHC específicas o múltiples péptidos pueden estar asociados con una nanosfera común y una o más moléculas de MHC. La administración de combinaciones de estos péptidos incluye la administración de una población de nanoesferas que tienen múltiples péptidos unidos y/o que se administran múltiples poblaciones de nanoesferas, cada una de las cuales con un péptido específico unido o una combinación de tales nanoesferas que incluye nanoesferas con 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más péptidos unidos a 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más nanoesferas.

TABLA 1A. Epítomos HLA restringidos a la clase I para T1D

Antígeno	Epítipo	HLA	Secuencia de aminoácidos	Comentarios	Referencias
GAD65	114-123	A2	VMNILLQYVV (SEQ ID NO: 14)	Reactividad detectada en ratones HDD inmunizados y pacientes con T1D	Blancou et. al. 2007, Panina-Bordignon et al. 1995, Mallone et al. 2007
	536-545	A2	RMMEYGTMMV (SEQ ID NO: 15)	Reactividad detectada en ratones HDD inmunizados con plásmidos y pacientes con T1D	Blancou et. al. 2007
GFAP	143-151	A2	NLAQTDLATV (SEQ ID NO: 16)	Reactividad detectada en pacientes T1D	Ouyang et. al., 2006
	214-222	A2	QLARQQVHV (SEQ ID NO: 17)	Reactividad detectada en pacientes T1D	Ouyang et al. 2006
IA-2	172-180	A2	SLSPLQAEI (SEQ ID NO: 18)	Reactividad detectada en pacientes T1D	Ouyang et al. 2006
	482-490	A2	SLAAGVKLL (SEQ ID NO: 19)	Reactividad detectada en pacientes T1D	Ouyang et al. 2006
	805-813	A2	VIVMLTPLV (SEQ ID NO: 20)	Reactividad detectada en ratones HDD inmunizados con plásmidos y pacientes con T1D	Blancou et al. 2007
pplAPP	5-13	A2	KLQVFLIVL (SEQ ID NO: 21)	Reactividad detectada en pacientes con T1D	Panagiotopoulos et al. 2003, Jarchum et al. 2008
	9-17	A2	FLIVLSVAL (SEQ ID NO: 22)	Reactividad detectada en pacientes T1D	Ouyang et al. 2006
IGRP	152-160	A2	FLWSVFMLI (SEQ ID NO: 23)	Reactividad detectada en pacientes T1D	Ouyang et al. 2006
	211-219	A2	NLFLFLFAV (SEQ ID NO: 24)	Reactividad detectada en pacientes T1D	Jarchum et al. 2008
	215-223	A2	FLFAVG FYL (SEQ ID NO: 25)	Reactividad detectada en pacientes T1D	Ouyang et al. 2006, Jarchum et al. 2008
	222-230	A2	YLLLRVLNI (SEQ ID NO: 26)	Reactividad detectada en pacientes con T1D	Jarchum et al. 2008
	228-236	A2	LNIDLLWSV (SEQ ID NO: 2)	Reactividad al epítipo correspondiente de IGRP murino (que difiere en 2 aminoácidos) detectado en ratones HDD inmunizados	Takaki et al. 2006
	265-273	A2	VLFG LGFAI (SEQ ID NO: 3)	Reactividad detectada en ratones HDD inmunizados y pacientes con T1D de inicio reciente	Takaki et al. 2006, Unger et al. 2007, Jarchum et al. 2008
	293-301	A2	RLLCALTSL (SEQ ID NO: 27)	Reactividad detectada en pacientes T1D	Ouyang et al. 2006
Proinsulina	L2-10	A2	ALWMRLPL (SEQ ID NO: 28)	Reactividad detectada en ratones HDD y pacientes con T1D	Mallone et al. 2007, Jarchum et al. 2007
	L3-11	A2	LWMRLPLL	Reactividad al epítipo correspondiente de la proinsulina murina 1 (que difiere	Jarchum et al.

			(SEQ ID NO: 29)	en 5 aminoácidos) detectada en ratones HHD	2007
	L6-14	A2	RLLPLLALL (SEQ ID NO: 30)	Reactividad detectada en pacientes T1D	Mallone et al. 2007
	B5-14	A2	HLCGSHLVEA (SEQ ID NO: 31)	Reactividad con el correspondiente epítipo de proinsulina 1 de ratón (que difiere en un aminoácido) detectado en ratones HHD	Jarchum et al. 2007
	B10-18	A2	HLVEALYLV (SEQ ID NO: 1)	Reactividad detectada en ratones HHD inmunizados y pacientes con T1D	Toma et al. 2005, Hassainya et al. 2005, Pinkse et al. 2005
	B 14-22	A3, A11	ALYLVCGER (SEQ ID NO: 32)	Reactividad detectada en pacientes T1D	Toma et al. 2005
	B15-24	A24	LYLVCGERGF (SEQ ID NO: 33)	Reactividad detectada en pacientes T1D	Toma et al. 2005
	B17-25	A1, A3	LVCGERGFF (SEQ ID NO: 34)	Reactividad detectada en pacientes con T1D	Toma et al. 2005, Hassainya et al. 2005
	B18-27	A1, A2, B8, B18	VCGERGFFYT (SEQ ID NO: 35)	Reactividad detectada en pacientes T1D	Toma et al. 2005
	B20-27	A11, B8	GERGFFYT (SEQ ID NO: 36)	Reactividad detectada en pacientes con T1D	Toma et al. 2005
	B21-29	A3	ERGFFYTPK (SEQ ID NO: 37)	Reactividad detectada en pacientes T1D	Toma et al. 2005
	B25-C1	B8	FYTPKTRRE (SEQ ID NO: 38)	Reactividad detectada en pacientes T1D	Toma et al. 2005
	B27-C5	B8	TPKTRREAEDL (SEQ ID NO: 39)	Reactividad detectada en pacientes T1D	Toma et al. 2005
	C20-28	A2	SLQPLALEG (SEQ ID NO: 40)	Reactividad detectada en ratones HHD inmunizados con péptidos	Hassainya et al. 2005
	C25-33	A2	ALEGLQKR (SEQ ID NO: 41)	Reactividad detectada en ratones HHD inmunizados con péptidos	Hassainya et al. 2005
	C29-A5	A2	SLQKRGIVEQ (SEQ ID NO: 42)	Reactividad detectada en ratones HHD inmunizados con péptidos	Hassainya et al. 2005
	A1-10	A2	GIVEQCCTSI (SEQ ID NO: 43)	Reactividad detectada en ratones HHD inmunizados con péptidos	Hassainya et al. 2005
	A2-10	A2	IVEQCCTSI (SEQ ID NO: 44)	Reactividad al epítipo correspondiente de proinsulina 1 de ratón (que difiere en un aminoácido) detectado en ratones HHD	Jarchum et al. 2007
	A12-20	A2	SLYQLENYC (SEQ ID NO: 45)	Reactividad detectada en ratones HHD inmunizados con péptidos	Hassainya et al. 2005

GAD65: 65 kDa Ácido glutámico descarboxilasa, GFAP: proteína ácida fibrilar glial, IA-2: antígeno asociado a insulinoma 2, pplAPP: proteína precursora de polipéptido amiloide de islote, IGRP: proteína relacionada con subunidad catalítica de glucosa 6-fosfatasa específico de islote

Tabla 1B. Epítomos restringidos de HLA clase I para MS

Antígeno	Epítipo	HLA	Secuencia de aminoácidos	Comentarios	Referencias
MAG	287-295	A2	SLLELEEV (SEQ ID NO: 46)	Reconocido por líneas celulares T CD8 ⁺ generadas a partir de pacientes con EM y sujetos sanos	Tsuchida et al. 1994
MAG	509-517	A2	LMWAKIGPV (SEQ ID NO: 47)	Reconocido por las líneas celulares T CD8 ⁺ generadas a partir de pacientes con EM e individuos sanos	Tsuchida et al. 1994
MAG	556-564	A2	VLFSSDFRI (SEQ ID NO: 48)	Reconocido por las líneas celulares T CD8 ⁺ generadas a partir de pacientes con EM y personas sanas	Tsuchida et al. 1994
MBP	110-118	A2	SLSRFSWGA (SEQ ID NO: 49)	Reconocido por las líneas celulares T CD8 ⁺ generadas a partir de pacientes con EM y sujetos sanos	Tsuchida et al. 1994, Jurewicz et al. 1998
MOG	114-122	A2	KVEDPFYWV (SEQ ID NO: 50)	Reactividad detectada en ratones HHD inmunizados con péptidos	Mars et al. 2007
MOG	166-175	A2	RTFDPHFLRV (SEQ ID NO: 51)	Reactividad detectada en ratones HHD inmunizados con péptidos	Mars et al. 2007
MOG	172-180	A2	FLRVPCWKI (SEQ ID NO: 52)	Reactividad detectada en ratones HHD inmunizados con péptidos	Mars et al. 2007
MOG	179-188	A2	KITLFVIVPV (SEQ ID NO: 53)	Reactividad detectada en ratones HHD inmunizados con péptidos	Mars et al. 2007
MOG	188-196	A2	VLGPLVALI (SEQ ID NO: 54)	Reactividad detectada en ratones HHD inmunizados con péptidos	Mars et al. 2007
MOG	181-189	A2	TLFVIVPVL (SEQ ID NO: 55)	Reactividad detectada en ratones HHD inmunizados con péptido	Mars et al. 2007
MOG	205-214	A2	RLAGQFLEEL (SEQ ID NO: 56)	Reactividad detectada en ratones HHD inmunizados con péptidos	Mars et al. 2007
PLP	80-88	A2	FLYGALLLA (SEQ ID NO: 57)	Reconocido por las líneas celulares T CD8 ⁺ generadas de pacientes con EM y sujetos sanos	Tsuchida et al. 1994, Dressel et al. 1997

MBP: proteína básica de mielina, MAG: glicoproteína asociada a mielina, MOG: glicoproteína de oligodendrocito de mielina, PLP: proteína proteolípida

- 5 En ciertas realizaciones, el tamaño de una proteína o polipéptido (de tipo natural o modificado), incluyendo cualquier complejo de una proteína o péptido de interés y en particular una fusión MHC/péptido, puede comprender, pero no se limita a 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500 moléculas amino o más, incluyendo cualquier intervalo o valor derivable en el mismo, o derivado del mismo. En ciertos aspectos, pueden utilizarse como antígenos 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos contiguos, incluyendo derivados de los mismos, y fragmentos de un autoantígeno, tales como aquellas secuencias de aminoácidos descritas y referenciadas en la presente memoria descriptiva. Se contempla que los polipéptidos pueden ser mutados por truncamiento, haciéndolos más cortos que su correspondiente forma de tipo natural, pero también pueden ser alterados fusionando o conjugando una secuencia de proteína heteróloga con una función particular (por ejemplo, para la presentación como un complejo de proteína, para aumentar la inmunogenicidad, etc.).

- 20 Las composiciones proteínaceas pueden prepararse mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica, incluyendo (i) la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos a través de técnicas de biología molecular convencionales, (ii) el aislamiento de compuestos proteínicos a partir de fuentes naturales o (iii) la síntesis química

de materiales proteínicos. El nucleótido así como las secuencias de proteínas, polipéptidos y péptidos para diversos genes se han descrito previamente y se pueden encontrar en las bases de datos computarizadas reconocidas. Una de esas bases de datos es la base de datos de GenBank y GenPept del National Center for Biotechnology Information (en Internet en ncbi.nlm.nih.gov/). La totalidad o parte de las regiones de codificación para estos genes pueden amplificarse y/o expresarse utilizando las técnicas descritas en la presente memoria o como serían conocidas por los expertos en la técnica.

Las variantes de secuencia de aminoácidos de epitopos autoantigénicos y otros polipéptidos de estas composiciones pueden ser variantes de sustitución, inserción o delección. Una modificación en un polipéptido de la invención puede afectar a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 170, 172, 173, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 20 212, 213, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 248, 246, 247, 248, 249, 250, 248, 248, 249, 240, 248, 249, 240, 241, 242, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 348, 346, 347, 348, 346, 347, 348, 349, 347, 348, 349, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 351, 352, 353, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 o más aminoácidos no contiguos o contiguos de un péptido o polipéptido, en comparación con el tipo natural. Un péptido o polipéptido que da como resultado una respuesta autoinmune y en particular una respuesta autoinmune patológica se contempla para su uso en métodos de la invención.

Las variantes de delección típicamente carecen de uno o más residuos de la secuencia de aminoácidos natural o de tipo natural. Pueden eliminarse los residuos individuales o pueden eliminarse varios aminoácidos contiguos. Se puede introducir un codón de terminación (por sustitución o inserción) en una secuencia de ácido nucleico codificante para generar una proteína truncada. Los mutantes de inserción típicamente implican la adición de material en un punto no terminal en el polipéptido. Esto puede incluir la inserción de uno o más residuos. También se pueden generar adiciones terminales, denominadas proteínas de fusión.

Las variantes de sustitución típicamente contienen el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y pueden diseñarse para modular una o más propiedades del polipéptido, con o sin la pérdida de otras funciones o propiedades. Las sustituciones pueden ser conservadoras, es decir, se reemplaza un aminoácido por uno de forma y carga similares. Las sustituciones conservadoras son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina a serina; arginina a lisina; asparagina a glutamina o histidina; aspartato a glutamato; cisteína a serina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina; metionina a leucina o isoleucina; fenilalanina a tirosina, leucina o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina; tirosina a triptófano o fenilalanina; y valina a isoleucina o leucina. Alternativamente, las sustituciones pueden ser no conservadoras de tal manera que se afecte una función o actividad de un polipéptido o péptido, tal como la avidez o afinidad por un receptor o receptores celulares. Los cambios no conservadores típicamente implican la sustitución de un residuo por uno que sea químicamente distinto, tal como un aminoácido polar o cargado para un aminoácido no polar o no cargado, y viceversa.

Las proteínas de la invención pueden ser recombinantes o ser sintetizadas in vitro. Alternativamente, una proteína recombinante puede aislarse de bacterias u otras células hospedadoras.

El término "codón funcionalmente equivalente" se utiliza en este documento para referirse a codones que codifican el mismo aminoácido, tales como los seis codones para arginina o serina, y también se refiere a codones que codifican aminoácidos biológicamente equivalentes (véase la Tabla 2, más adelante).

TABLA 2 Tabla de codones

Aminoácidos			Codones
Alanina	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Cisteína	Cys	C	UGC UGU
Ácido aspártico	Asp	D	GAC GAU
Ácido glutámico	Glu	E	GAA GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU
Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Histidina	His	H	CAC CAU
Isoleucina	Ile	I	AUA AUC AUU
Lisina	Lys	K	AAA AAG
Leucina	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAC AAU
Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Arginina	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACI
Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU

- 5 También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico pueden incluir residuos adicionales, tales como aminoácidos N o C-terminales adicionales, o secuencias de ácido nucleico 5' ó 3', respectivamente, y sin embargo todavía esencialmente como se establece en una de las secuencias descritas en este documento, siempre y cuando la secuencia cumpla los criterios expuestos anteriormente, incluyendo el mantenimiento de la actividad de la proteína biológica (por ejemplo, la inmunogenicidad). La adición de secuencias terminales se aplica particularmente a secuencias de ácido nucleico que pueden, por ejemplo, incluir varias secuencias no codificantes que flanquean cualquiera de las porciones 5' o 3' de la región codificante.
- 10 Se contempla que en las composiciones de la invención, haya entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 10 mg de proteína total por ml. Por lo tanto, la concentración de proteína en una composición puede ser de al menos aproximadamente o como máximo aproximadamente 0,001, 0,010, 0,050, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 50, 100 µg/ml o mg/ml o más (o cualquier intervalo derivable del mismo). De este, aproximadamente, al menos aproximadamente, o como máximo
- 15 aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, , 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, , 95, 96, 97, 98, 99, 100% puede ser el complejo péptido/MHC/nanosfera.
- 20 La presente invención contempla la administración de un complejo de péptido/MHC/nanosfera para efectuar un tratamiento o terapia preventiva contra el desarrollo de una enfermedad o afección asociada con respuestas autoinmunes.
- Además, la patente de EE.UU. N°. 4.554.101 (Hopp) muestra la identificación y preparación de epítopes a partir de secuencias de aminoácidos primarios basándose en la hidrofiliidad. A través de los métodos descritos en Hopp, un

experto en la técnica sería capaz de identificar epítopos potenciales dentro de una secuencia de aminoácidos y confirmar su inmunogenicidad. Numerosas publicaciones científicas también se han dedicado a la predicción de la estructura secundaria y a la identificación de epítopos, a partir de análisis de secuencias de aminoácidos (Chou & Fasman, 1974a, b, 1978a,b, 1979). Cualquiera de estos puede utilizarse, si se desea, para complementar las enseñanzas de Hopp en la Patente de EE.UU. N°. 4.554.101.

2. Otros componentes antigénicos

Las moléculas distintas de los péptidos pueden usarse como antígenos o fragmentos antigénicos en el complejo con las moléculas de MHC, tales moléculas incluyen, pero no se limitan a, carbohidratos, lípidos, moléculas pequeñas y similares. Los carbohidratos son componentes principales de la superficie exterior de una variedad de células. Ciertos carbohidratos son característicos de diferentes etapas de diferenciación y muy a menudo estos hidratos de carbono son reconocidos por anticuerpos específicos. La expresión de carbohidratos distintos se puede restringir a tipos específicos de células. Se ha demostrado que las respuestas de los autoanticuerpos a los antígenos del endometrio y del suero son una característica común de la endometriosis. Se ha descrito una respuesta de autoanticuerpos séricos en la endometriosis a un número de antígenos previamente identificados, incluyendo la glicoproteína 2-Heremans Schmidt y la anhidrasa carbónica, que es específica para un epítipo de carbohidrato (Yeaman et al., 2002).

C. Substratos/Nanoesferas

En un cierto aspecto, los complejos antígeno/MHC están acoplados operativamente a un sustrato. Un sustrato puede estar en forma de una nanopartícula que comprende un material biocompatible y bioabsorbible. Un sustrato también puede estar en forma de una nanopartícula tales como las descritas anteriormente en la publicación de EE.UU. 20090155292. Las nanopartículas pueden tener una estructura de dimensión variable y se conocen de manera diversa como una nano esfera o nano esfera biocompatible y biodegradable. Dichas formulaciones particuladas que contienen un complejo antígeno/MHC pueden formarse por acoplamiento covalente o no covalente del complejo a la nano esfera.

Las nanoesferas consisten típicamente en un núcleo sustancialmente esférico y opcionalmente en una o más capas. El núcleo puede variar en tamaño y composición. Además del núcleo, la nano esfera puede tener una o más capas para proporcionar funcionalidades apropiadas para las aplicaciones de interés. Los espesores de las capas, si están presentes, pueden variar dependiendo de las necesidades de las aplicaciones específicas. Por ejemplo, las capas pueden impartir propiedades ópticas útiles.

Las capas también pueden impartir funcionalidades químicas o biológicas, a las que se hace referencia en la presente como capas químicamente activas o biológicamente activas, y para estas funcionalidades la capa o capas pueden variar típicamente de aproximadamente 0,001 micrómetros (1 nanómetro) a aproximadamente 10 micrómetros o más (dependiendo del diámetro de la nano esfera deseado), estando estas capas aplicadas típicamente sobre la superficie exterior de la nano esfera.

Preferiblemente, las composiciones del núcleo y las capas pueden variar a condición de que las nanoesferas sean biocompatibles y bioabsorbibles. El núcleo podría ser de composición homogénea, o un compuesto de dos o más clases de material dependiendo de las propiedades deseadas. En ciertos aspectos, se utilizarán nanoesferas metálicas. Estas nanoesferas metálicas pueden formarse a partir de Fe, Ca, Ga y similares.

Como se ha indicado anteriormente, la nano esfera puede, además del núcleo, incluir una o más capas. La nano esfera puede incluir una capa que consiste en un azúcar biodegradable u otro polímero. Los ejemplos de capas biodegradables incluyen, pero no se limitan a, dextrano; polietilenglicol; poli(óxido de etileno); manitol; poli(ésteres) a base de polilactida (PLA), poliglicolida (PGA), policaprolactona (PCL); poli(hidroxalcanoato)s de la clase PHB-PHV; y otros poli(sacáridos) modificados tales como almidón, celulosa y quitosano. Adicionalmente, la nano esfera puede incluir una capa con superficies adecuadas para unir funcionalidades químicas para sitios de unión química o de acoplamiento.

Las capas se pueden producir en las nanoesferas de una diversidad de formas conocidas por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen técnicas de química sol-gel tales como las descritas en Iler (1979); Brinker y Scherer (1990). Otros enfoques para producir capas sobre nanoesferas incluyen la química de las superficies y técnicas de encapsulación como las descritas en Partch y Brown (1998); Pekarek et al. (1994); Hanprasopwattana (1996); Davies (1998); y sus referencias. También pueden usarse técnicas de deposición de vapor; véase por ejemplo Golman y Shinohara (2000); y la Pat. de EE.UU. N° 6.387.498. Todavía otros enfoques incluyen técnicas de autoensamblado capa por capa tales como las descritas en Sukhorukov et al. (1998); Caruso et al. (1998); Caruso et al. (1999); Pat. de EE.UU. N° 6.103.379 y las referencias citadas en el mismo.

Las nanoesferas pueden formarse poniendo en contacto una fase acuosa que contiene el complejo antígeno/MHC y un polímero y una fase no acuosa seguido por evaporación de la fase no acuosa para provocar la coalescencia de las partículas de la fase acuosa como se muestra en la Patente de EE.UU. N°. 4.589.330 ó 4.818.542. Los polímeros preferidos para tales preparaciones son copolímeros o polímeros naturales o sintéticos seleccionados del grupo que consiste en glectina agar, almidón, arabinogalactano, albúmina, colágeno, ácido poliglicólico, ácido poliláctico,

glicolida L (-) lactida, poli(epsilon-caprolactona), poli(epsilon-caprolactona-CO-ácido láctico), poli(epsilon-caprolactona-CO-ácido glicólico), poli(beta-ácido hidroxibutírico), poli(óxido de etileno), polietileno, poli(alquil-2-cianoacrilato), poli(hidroxietil metacrilato), poliamidas, poli(aminoácidos), poli(2-hidroxietil DL-aspartamida), poli(éster urea), poli (L-fenilalanina/etilenglicol/1,6-diisocianatohexano) y poli (metacrilato de metilo).

- 5 Polímeros particularmente preferidos son poliésteres, tales como ácido poliglicólico, ácido poliláctico, glicolida-L(-) lactida, poli(epsilon-caprolactona), poli(epsilon-caprolactona-CO-ácido láctico) y poli(epsilon-caprolactona-CO-ácido glicólico). Los disolventes útiles para disolver el polímero incluyen: agua, hexafluoroisopropanol, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, hexano, benceno o sesquihidrato de hexafluoroacetona.

D. Acoplamiento del complejo antígeno-MHC con nanoesferas

- 10 Con el fin de acoplar el sustrato o las nanoesferas a los complejos de antígeno-MHC, pueden aplicarse las siguientes técnicas.

La unión puede ser generada modificando químicamente el sustrato o la nanosfera que típicamente involucra la generación de "grupos funcionales" en la superficie, siendo dichos grupos funcionales capaces de unirse a un complejo antígeno-MHC, y/o enlazando la superficie opcionalmente modificada químicamente del sustrato o la nanopartícula con una unión covalente o no covalente con las denominadas "moléculas de enlace", seguido por la reacción del complejo antígeno-MHC con las nanoesferas obtenidas.

La expresión "molécula de enlace" significa una sustancia capaz de enlazarse con el sustrato o la nano esfera y también capaz de unirse a un complejo antígeno-MHC.

- 20 La expresión "grupos funcionales", tal como se utiliza en este documento anteriormente, no está restringida a grupos químicos reactivos que forman enlaces covalentes, sino que también incluye grupos químicos que conducen a una interacción iónica o enlaces de hidrógeno con el complejo antígeno-MHC. Por otra parte, debe observarse que no es posible una distinción estricta entre los "grupos funcionales" generados en la superficie y las moléculas de enlace que llevan "grupos funcionales", ya que a veces la modificación de la superficie requiere la reacción de moléculas de enlace más pequeñas tales como etilenglicol con la superficie de la nano esfera.

- 25 Los grupos funcionales o las moléculas enlazantes que las soportan se pueden seleccionar de grupos amino, grupos de ácido carbónico, tioles, tioéteres, disulfuros, guanidino, grupos hidroxilo, grupos amina, dioles vicinales, aldehídos, grupos alfa-haloacetilo, organilos de mercurio, grupos éster, haluro de ácido, tioéster de ácido, anhídrido de ácido, isocianatos, isotiocianatos, haluros de ácido sulfónico, imidoésteres, diazoacetatos, sales de diazonio, 1,2-dicetonas, ácidos fosfónicos, ésteres de ácido fosfórico, ácidos sulfónicos, azolidas, imidazoles, indoles, N-maleimidadas, compuestos alfa-beta-insaturados de carbonilo, arilhalogenuros o sus derivados.

- 30 Ejemplos no limitantes para otras moléculas de enlace con pesos moleculares superiores son moléculas de ácido nucleico, polímeros, copolímeros, agentes de acoplamiento polimerizables, sílice, proteínas y moléculas tipo cadenas que tienen una superficie con la polaridad opuesta con respecto al sustrato o nanosfera. Los ácidos nucleicos pueden proporcionar un enlace a moléculas de afinidad que contienen por sí mismos moléculas de ácido nucleico, aunque con una secuencia complementaria con respecto a la molécula de enlace.

Como ejemplos de agentes de acoplamiento polimerizables se pueden citar diacetileno, estireno butadieno, acetato de vinilo, acrilato, acrilamida, compuestos vinílicos, estireno, óxido de silicón, óxido de boro, óxido de fósforo, boratos, pirrol, polipirrol y fosfatos.

- 40 La superficie del sustrato o nano esfera puede modificarse químicamente, por ejemplo mediante la unión de derivados de ácido fosfónico que tienen grupos reactivos funcionales. Un ejemplo de estos derivados de éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico es el ácido imino-bis (metilénfosfona) carbónico que puede sintetizarse de acuerdo con la reacción "Mannich-Moedritzer". Esta reacción de unión puede realizarse con un sustrato o una nano esfera tal como se obtiene directamente del procedimiento de preparación o después de un pretratamiento (por ejemplo con bromuro de trimetilsililo). En el primer caso, el derivado de ácido fosfónico (éster) puede desplazar, por ejemplo, componentes del medio de reacción que todavía están unidos a la superficie. Este desplazamiento se puede mejorar a temperaturas más altas. Por otra parte, se cree que el bromuro de trimetilsililo desalquila agentes de complejación a base de fósforo que contienen grupos alquilo, creando así nuevos sitios de unión para el derivado (éster) del ácido fosfónico. El derivado (éster) del ácido fosfónico, o las moléculas de unión unidas al mismo, pueden mostrar los mismos grupos funcionales que los dados anteriormente. Otro ejemplo del tratamiento superficial del sustrato o nano esfera implica el calentamiento en un diol, tal como etilenglicol. Debe tenerse en cuenta que este tratamiento puede ser redundante si la síntesis ya procedió en un diol. En estas circunstancias, el producto de síntesis obtenido directamente es probable que muestre los grupos funcionales necesarios. Sin embargo, este tratamiento es aplicable al sustrato o a la nanosfera que se produjeron en los agentes complejantes que contienen N o P. Si dicho sustrato o partícula se somete a un tratamiento posterior con etilenglicol, los ingredientes del medio de reacción (por ejemplo, el agente complejante) que todavía se unen a la superficie pueden ser reemplazados por el diol y/o se pueden desalquilar.

También es posible sustituir los agentes complejantes que contienen N aún unidos a la superficie de las partículas

por derivados de amina primaria que tienen un segundo grupo funcional. La superficie del sustrato o nano esfera también se puede recubrir con sílice. La sílice permite una conjugación química relativamente simple de moléculas orgánicas ya que la sílice reacciona fácilmente con ligantes orgánicos, tales como trietoxisilano o clorosilano. La superficie de la nano esfera también puede estar recubierta por homo- o copolímeros. Ejemplos de agentes de acoplamiento polimerizables son N-(3-aminopropil)-3-mercaptopbenzamidina, 3-(trimetoxisilil)propilhidrazida y 3-(trimetoxisilil)propilmaleimida. Otros ejemplos no limitativos de agentes de acoplamiento polimerizables se mencionan en la presente memoria. Estos agentes de acoplamiento se pueden usar solos o en combinación dependiendo del tipo de copolímero que se va a generar como revestimiento.

Otra técnica de modificación de superficie que puede usarse con sustratos o nanoesferas que contienen compuestos de metal de transición oxídicos es la conversión de los compuestos de metal de transición oxídicos por gas de cloro o agentes de cloración orgánicos a los correspondientes oxiclорuros. Estos oxiclорuros son capaces de reaccionar con nucleófilos, tales como grupos hidroxilo o amino, como se encuentran frecuentemente en biomoléculas. Esta técnica permite generar una conjugación directa con proteínas, por ejemplo, a través del grupo amino de las cadenas laterales de lisina. La conjugación con proteínas después de la modificación de la superficie con oxiclорuros puede efectuarse también utilizando un enlazador bi-funcional, tal como hidrazida del ácido maleimidopropiónico.

Para las técnicas de unión no covalentes, son particularmente adecuadas moléculas de tipo cadena que tienen una polaridad o carga opuesta a la del sustrato o superficie de nano esfera. Ejemplos de moléculas de unión que pueden estar unidas no covalentemente a nanoesferas del núcleo/envuelta implican tensioactivos aniónicos, catiónicos o zwitteriónicos, proteínas ácidas o básicas, poliaminas, poliamidas, polisulfona o ácido policarboxílico. La interacción hidrófoba entre el sustrato o la nano esfera y el reactivo anfífilico que tiene un grupo funcional reactivo puede generar el enlace necesario. En particular, son útiles moléculas de tipo cadena con carácter anfífilico, tales como fosfolípidos o polisacáridos derivatizados, que pueden reticularse entre sí. La absorción de estas moléculas en la superficie puede lograrse por coincubación. La unión entre la molécula de afinidad y el sustrato o la nano esfera también puede estar basada en enlaces no covalentes y autoorganizables. Un ejemplo de ello implica sondas de detección sencillas con biotina como molécula de enlace y moléculas acopladas a avidina o estreptavidina.

Los protocolos para las reacciones de acoplamiento de grupos funcionales a moléculas biológicas pueden encontrarse en la bibliografía, por ejemplo en "Bioconjugate Techniques" (Greg T. Hermanson, Academic Press 1996). La molécula biológica (por ejemplo, molécula de MHC o derivado del mismo) puede acoplarse a la molécula de enlace, de forma covalente o no covalente, de acuerdo con procedimientos estándar de química orgánica tales como oxidación, halogenación, alquilación, acilación, adición, sustitución o amidación. Estos métodos para acoplar la molécula de enlace unida covalentemente o no covalentemente pueden ser aplicados antes del acoplamiento de la molécula de enlace al sustrato o nanosfera o posteriormente. Además, es posible, por medio de la incubación, efectuar una unión directa de moléculas al sustrato o nanoesferas previamente tratados correspondientes (por ejemplo, mediante bromuro de trimetilsililo), que presentan una superficie modificada debido a este pretratamiento (por ejemplo, una carga más alta o superficie polar).

E. Producción de proteínas

La presente invención describe polipéptidos, péptidos y proteínas para su uso en diversas realizaciones de la presente invención. Por ejemplo, los péptidos específicos y sus complejos se ensayan en cuanto a sus capacidades para inducir o modular una respuesta inmune. En realizaciones específicas, todos o parte de los péptidos o proteínas de la invención también pueden sintetizarse en solución o sobre un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Varios sintetizadores automáticos están comercialmente disponibles y pueden usarse de acuerdo con protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, Stewart y Young (1984); Tarn et al. (1983); Merrifield (1986); y Barany y Merrifield (1979). Alternativamente, puede emplearse tecnología de ADN recombinante en la que una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de la invención se inserta en un vector de expresión, se transforma o transfecta en una célula huésped apropiada y se cultiva en condiciones adecuadas para la expresión.

Una realización de la invención incluye el uso de transferencia génica a células, incluyendo microorganismos, para la producción de proteínas. El gen para la proteína de interés puede transferirse a células huésped apropiadas seguido del cultivo de células en las condiciones apropiadas. Se puede emplear un ácido nucleico que codifique prácticamente cualquier polipéptido. La generación de vectores de expresión recombinantes, y los elementos incluidos en los mismos, son conocidos por los expertos en la técnica y se discuten brevemente en la presente memoria. Ejemplos de líneas de células huésped de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, células Vero y HeLa, otras líneas de células B y T, tales como CEM, 721.221, H9, Jurkat, Raji, así como líneas celulares de ovario de hámster chino, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN y MDCK. Además, se puede escoger una cepa de célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico de la manera deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteínicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraducciona y la modificación de proteínas. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas huésped apropiados para asegurar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña expresada.

Se pueden usar varios sistemas de selección incluyendo, pero sin limitarse a, genes de timidina quinasa HSV,

hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y adenina fosforribosiltransferasa, en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. También se puede usar la resistencia a los anti-metabolitos como base de selección: para dhfr, que confiere resistencia frente a trimetoprim y metotrexato; gpt, que confiere resistencia frente al ácido micofenólico; neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G418; e hyg, que confiere resistencia frente a la higromicina.

5 F. Ácidos nucleicos

La presente invención puede incluir polinucleótidos recombinantes que codifican las proteínas, polipéptidos y péptidos de la invención. Se incluyen las secuencias de ácidos nucleicos para autoantígenos y moléculas de MHC para presentar los autoantígenos y se pueden usar para preparar un complejo péptido/MHC.

10 Tal como se utiliza en esta solicitud, el término "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es recombinante o ha sido aislada sin el ácido nucleico genómico total. Dentro del término "polinucleótido" se incluyen oligonucleótidos (ácidos nucleicos de 100 residuos o menos de longitud), vectores recombinantes, que incluyen, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus y similares. Los polinucleótidos incluyen, en ciertos aspectos, secuencias reguladoras, aisladas sustancialmente lejos de sus genes naturales o secuencias que codifican proteínas. Los polinucleótidos pueden ser ARN, ADN, análogos de los mismos, o una combinación de los mismos.

15 A este respecto, el término "gen", "polinucleótido" o "ácido nucleico" se utiliza para referirse a un ácido nucleico que codifica una proteína, polipéptido o péptido (incluyendo cualquier secuencia requerida para la transcripción apropiada, modificación post-traduccional, o localización). Como comprenderán los expertos en la técnica, este término abarca secuencias genómicas, casetes de expresión, secuencias de cDNA y segmentos de ácido nucleico de ingeniería más pequeños que expresan o pueden adaptarse para expresar proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión y mutantes. Un ácido nucleico que codifica todo o parte de un polipéptido puede
20 contener una secuencia de ácido nucleico contigua que codifica la totalidad o una porción de dicho polipéptido de las siguientes longitudes: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 610, 640, 660, 670, 680, 690,
25 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1095, 1100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 9000, 10000 o más nucleótidos, nucleósidos o pares de bases. También se contempla que un polipéptido particular de una especie dada pueda codificarse por ácidos nucleicos que contengan variaciones naturales que tengan secuencias de ácido nucleico
30 ligeramente diferentes, pero que, no obstante, codifiquen la misma, o sustancialmente, una proteína, polipéptido o péptido similar.

En realizaciones particulares, la invención se refiere a segmentos de ácido nucleico aislados y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ácido nucleico que codifican un autoantígeno y/o una molécula de MHC. El término "recombinante" puede usarse conjuntamente con un polipéptido o el nombre de un polipéptido
35 específico, y esto se refiere generalmente a un polipéptido producido a partir de una molécula de ácido nucleico que ha sido manipulada in vitro o que es un producto de replicación de tal molécula.

Los segmentos de ácido nucleico utilizados en la presente invención, independientemente de la longitud de la propia secuencia codificante, pueden combinarse con otras secuencias de ácido nucleico, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiples, otros segmentos
40 codificantes y similares, de modo que su longitud total pueda variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que puede emplearse un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando preferiblemente limitada la longitud total por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ácido nucleico recombinante deseado. En algunos casos, una secuencia de ácido nucleico puede codificar una secuencia polipeptídica con secuencias codificantes heterólogas adicionales, por ejemplo para permitir la purificación del polipéptido, el transporte, la secreción, la modificación postraduccional, o para beneficios terapéuticos tales como el reconocimiento o la eficacia. Se puede añadir un marcador u otro polipéptido heterólogo a la secuencia que codifica el polipéptido modificado, en donde "heterólogo" se refiere a un polipéptido que no es el mismo que el polipéptido modificado.

IV. Composiciones para su uso en métodos terapéuticos

A. Respuesta inmune y ensayos

50 Como se ha discutido anteriormente, la invención se refiere a la evocación o modificación de una respuesta inmune en un sujeto contra un autoantígeno. En una realización, la respuesta o condición inmune resultante puede proteger o tratar a un sujeto que tiene, es sospechoso de tener, o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o síntomas relacionados con una respuesta autoinmune.

1. Inmunoensayos

55 La presente invención incluye la implementación de ensayos serológicos para evaluar si, y hasta qué punto, una respuesta inmune está presente, es inducida, evocada o modificada por un complejo péptido/MHC/nanosfera. Existen muchos tipos de inmunoensayos que pueden ser implementados. Los inmunoensayos abarcados por la

presente invención incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la Patente de EE.UU. N° 4.367.110 (ensayo en sandwich de doble anticuerpo monoclonal) y la Patente de EE.UU. N° 4.452.901 (transferencia de Western). Otros ensayos incluyen inmunoprecipitación de ligandos marcados e inmunocitoquímica, tanto in vitro como in vivo.

Un método para cuantificar el número de células T CD8⁺ específicas de antígeno circulantes es el ensayo de tetrámero. En este ensayo, un epítipo específico está unido a formas tetrámeras sintéticas de moléculas MHC de clase I marcadas fluorescentemente. Dado que las células T CD8⁺ reconocen el antígeno en forma de péptidos cortos unidos a moléculas de Clase I, las células con el receptor de células T apropiado se unirán a los tetrámeros marcados y se pueden cuantificar mediante citometría de flujo. Aunque este método es menos lento que un ensayo ELISPOT, el ensayo de tetrámero mide solamente la unión, no la función. No todas las células que se unen a un antígeno particular se activan necesariamente. Sin embargo, se ha demostrado la correlación entre los ensayos ELISPOT, tetrámero y citotoxicidad (Goulder et al, 2000).

Los inmunoensayos son generalmente ensayos de unión. Ciertos inmunoensayos preferidos son los diversos tipos de ensayos inmunosorbentes ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA) o ensayos basados en perlas, tales como la tecnología Luminex.RTM., conocida en la técnica.

La detección inmunohistoquímica utilizando secciones de tejido es también particularmente útil.

En un ejemplo de ELISA, los anticuerpos o antígenos se inmovilizan en una superficie seleccionada, tal como un pocillo en una placa de microtitulación de poliestireno, varilla o soporte de columna. A continuación, se añade a los pocillos una composición de ensayo que se sospecha que contiene el antígeno o anticuerpo deseado, tal como una muestra clínica. Después de la unión y el lavado para eliminar complejos inmunitarios no enlazados específicamente, se puede detectar el antígeno o anticuerpo unido. La detección se logra generalmente mediante la adición de otro anticuerpo, específico para el antígeno o anticuerpo deseado, que está unido a un marcador detectable. Este tipo de ELISA se conoce como "ELISA sandwich". La detección también se puede lograr mediante la adición de un segundo anticuerpo específico para el antígeno deseado, seguido por la adición de un tercer anticuerpo que tiene afinidad de unión para el segundo anticuerpo, estando el tercer anticuerpo unido a un marcador detectable. Las variaciones en las técnicas de ELISA son conocidas por los expertos en la técnica.

También son posibles ELISAs de competición en los que las muestras de ensayo compiten por la unión con cantidades conocidas de antígenos o anticuerpos marcados. La cantidad de especies reactivas en la muestra desconocida se determina mezclando la muestra con las especies marcadas conocidas antes o durante la incubación con pocillos recubiertos. La presencia de especies reactivas en la muestra actúa para reducir la cantidad de especies marcadas disponibles para la unión al pocillo y, por lo tanto, reduce la señal final.

Independientemente del formato utilizado, los ELISA tienen ciertas características en común, tales como recubrimiento, incubación o unión, lavado para eliminar especies no específicamente unidas, y detección de los complejos inmunes unidos.

El antígeno o anticuerpos también pueden estar unidos a un soporte sólido, tal como en forma de placa, perlas, varillas de medición, membranas o matriz de columna, y la muestra a analizar se aplica al antígeno o anticuerpo inmovilizado. Al revestir una placa con antígeno o anticuerpo, generalmente se incubarán los pocillos de la placa con una solución del antígeno o anticuerpo, ya sea durante la noche o durante un periodo especificado. Los pocillos de la placa se lavarán entonces para eliminar el material adsorbido de manera incompleta. Cualquier superficie disponible restante de los pocillos se "recubre" después con una proteína no específica que es antigénicamente neutra con respecto a los antiseros de ensayo. Estos incluyen albúmina de suero bovino (BSA), caseína y soluciones de leche en polvo. El revestimiento permite el bloqueo de sitios de adsorción inespecíficos sobre la superficie de inmovilización y reduce así el fondo causado por la unión no específica de antiseros sobre la superficie.

En los ELISA, es más habitual usar un medio de detección secundario o terciario que un procedimiento directo. Por lo tanto, después de la unión del antígeno o anticuerpo al pocillo, el revestimiento con un material no reactivo para reducir el fondo y el lavado para eliminar el material no unido, la superficie de inmovilización se pone en contacto con la muestra clínica o biológica a ensayar en condiciones eficaces para permitir la formación de la inmunidad compleja (antígeno/anticuerpo). La detección del complejo inmune entonces requiere un ligando o anticuerpo de unión secundaria marcado, o un ligando o anticuerpo de unión secundaria en conjunción con un anticuerpo terciario marcado o un tercer ligando de unión.

B. Evaluación de una respuesta o condición autoinmune

Además de la utilización de proteínas, polipéptidos y/o péptidos para tratar o prevenir una afección autoinmune, la presente invención contempla el uso de estos polipéptidos, proteínas y/o péptidos de una variedad de formas, incluyendo la detección de la presencia de autoantígenos o una condición autoinmune para diagnosticar la presencia de ciertas poblaciones o condiciones de células autorreactivas. Un método para detectar la presencia de autorreactividad implica las etapas de obtener una muestra de un individuo, por ejemplo, de su sangre, saliva, tejidos, hueso, músculo, cartílago o piel. Después del aislamiento de la muestra, se pueden llevar a cabo ensayos de diagnóstico que utilizan los polipéptidos, proteínas y/o péptidos de la presente invención para detectar la presencia

de autorreactividad, y tales técnicas de ensayo para determinar tales en una muestra son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen métodos tales como ensayos de tetrámeros, inmunoensayos, análisis de transferencia Western y/o ensayos ELISA.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la frase "respuesta inmunitaria" o su equivalente "respuesta inmunológica" se refiere al desarrollo de una respuesta celular (mediada por células T específicas de antígeno o sus productos de secreción) dirigido contra un autoantígeno o un epítipo relacionado de un autoantígeno. Se produce una respuesta inmune celular mediante la presentación de epítopos polipeptídicos en asociación con moléculas MHC de Clase I o Clase II, para activar células CD4⁺ T auxiliares específicas de antígeno y/o células T citotóxicas CD8⁺. La respuesta también puede implicar la activación de otros componentes.

Para los fines de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, los términos "epítipo" y "determinante antigénico" se usan indistintamente para referirse a un sitio sobre un antígeno al que responden o reconocen las células B y/o T. Los epítopos de células B pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente por la exposición a disolventes desnaturizantes mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye típicamente al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 ó 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítopos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols (1996). Las células T reconocen epítopos continuos de aproximadamente nueve aminoácidos para células CD8 o aproximadamente 13-15 aminoácidos para células CD4. Las células T que reconocen el epítipo pueden ser identificadas mediante ensayos in vitro que miden la proliferación dependiente de antígeno, determinada por la incorporación de H³-timidina por células T cebadas en respuesta a un epítipo (Burke et al., 1994), por la eliminación dependiente del antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos, Tigges et al., 1996) o por la secreción de citoquinas. La presencia de una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse mediante ensayos de proliferación (células T CD4⁺) o CTL (linfocitos T citotóxicos).

Como se usa en este documento y en las reivindicaciones, los términos "anticuerpo" o "inmunoglobulina" se usan indistintamente y se refieren a cualquiera de varias clases de proteínas estructuralmente relacionadas que funcionan como parte de la respuesta inmune de un animal o receptor, proteínas que incluyen IgG, IgD, IgE, IgA, IgM y proteínas relacionadas.

Opcionalmente, un autoantígeno, o preferiblemente un epítipo de un autoantígeno, puede conjugarse químicamente o expresarse como una proteína de fusión con otras proteínas, tales como proteínas relacionadas con MHC y MHC.

Como se usa en este documento, los términos "agente inmunogénico" o "inmunógeno" o "antígeno" se usan indistintamente para describir una molécula capaz de inducir una respuesta inmunológica contra sí misma en la administración a un receptor, ya sea solo, en conjunción con un adyuvante, o presentado en un vehículo de visualización.

V. Dianas diagnósticas y terapéuticas

Las realizaciones de la invención pueden usarse para tratar o mejorar una serie de enfermedades inmunomediadas o autoinmunes, por ejemplo, diabetes, rechazo de injertos, etc. Las "enfermedades autoinmunes" incluyen enfermedades o trastornos derivados de y dirigidos contra los propios tejidos u órganos de un individuo o su manifestación o una afección resultante de los mismos. En una realización, se refiere a una condición que resulta o se ve agravada por la producción por células T que son reactivas con los tejidos y antígenos corporales normales. Ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, artritis (artritis reumatoide, como artritis aguda, artritis reumatoide crónica, artritis gotosa o gota, artritis gotosa aguda, artritis inmunológica aguda, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis inducida por colágeno tipo II, artritis infecciosa, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriática, enfermedad de Still, artritis vertebral y artritis reumatoide de comienzo juvenil, osteoartritis, artritis crónica progrediente, artritis deformante, poliartritis crónica primaria, artritis reactiva y espondilitis anquilosante), enfermedades inflamatorias de la piel hiperproliferativas, psoriasis tales como la psoriasis en placas, psoriasis gutate, psoriasis pustular y psoriasis de las uñas, atopía incluyendo enfermedades atópicas tales como fiebre del heno y síndrome de Job, dermatitis incluyendo dermatitis de contacto, dermatitis de contacto crónica, dermatitis exfoliativa, dermatitis alérgica, dermatitis de contacto alérgica, dermatitis herpetiforme, dermatitis numular, dermatitis seborreica, dermatitis no específica, dermatitis de contacto irritante primario y dermatitis atópica, síndrome hiper IgM ligado al x, síndrome alérgico intraocular, urticaria tal como urticaria crónica alérgica y urticaria idiopática crónica, incluyendo urticaria autoinmune crónica, miositis, polimiositis/dermatomiositis, dermatomiositis juvenil, necrólisis epidérmica tóxica, esclerodermia (incluyendo esclerodermia sistémica), esclerosis tal como esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (EM) tales como esclerosis espino-óptica, EM primaria progresiva (PPMS) y EM remitente recurrente (SMRR), esclerosis sistémica progresiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, esclerosis disseminata, esclerosis atáxica, neuromielitis óptica (NMO), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, enfermedades gastrointestinales mediadas por autoinmunidad, colitis tal como colitis ulcerativa, colitis ulcerosa, colitis microscópica, colitis colágena, colitis poliposa, enterocolitis necrotizante, colitis transmural y enfermedad inflamatoria intestinal autoinmune), inflamación intestinal, pioderma gangrenoso, eritema

5 nodosum, colangitis esclerosante primaria, síndrome de estrés respiratorio, incluyendo síndrome de estrés respiratorio en adultos o agudo, meningitis, inflamación de todo o parte de la úvea, iritis, coroiditis, un trastorno hematológico autoinmune, espondilitis reumatoide, sinovitis reumatoide, angioedema hereditario, lesión del nervio craneal como en la meningitis, herpes gestacional, penfigoide gestacional, prurito escroto, insuficiencia ovárica

10 prematura autoinmune, pérdida auditiva repentina debida a una enfermedad autoinmune, enfermedades mediadas por IgE, tales como anafilaxia y rinitis alérgica y atópica, encefalitis tales como la encefalitis de Rasmussen y encefalitis límbica y/o del cerebro, uveítis, tales como uveítis anterior, uveítis anterior aguda, uveítis granulomatosa, uveítis no granulomatosa, uveítis facoantigénica, uveítis posterior o uveítis autoinmune, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico, tal como glomerulonefritis crónica o aguda, tal como GN primaria, GN mediada

15 inmunológicamente, GN membranosa (nefropatía membranosa), GN idiopática membranosa o nefropatía membranosa idiopática, GN (MPGN) proliferativa de membrana o membranosa, incluyendo tipo I y tipo II y GN rápidamente progresiva, nefritis proliferativa, insuficiencia endocrina poliglandular autoinmune, balanitis incluyendo balanitis circumscripta plasmacellularis, balanopostitis, eritema anular centrífugo, eritema discromicum perstans, eritema multiforme, granuloma anular, liquen nitidus, liquen sclerosus et atrophicus, liquen simplex crónico, liquen espinuloso, liquen plano, ictiosis lamelar, hiperqueratosis epidermolítica, queratosis premaligna, pioderma gangrenoso, condiciones y respuestas alérgicas, reacción alérgica, eccema incluyendo eccema alérgico o atópico, eczema asteatótico, eczema disidrótico y eczema palmoplantar vesicular, asma tal como asma bronquial, asma bronquial y asma autoinmune, afecciones que implican infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas, reacciones inmunes contra antígenos extraños tales como grupos de sangre fetal AB-0 durante el embarazo,

20 enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, miocarditis autoinmune, deficiencia de la adhesión leucocitaria, lupus, incluyendo lupus nefritis, lupus cerebritis, lupus pediátrico, lupus no renal, lupus extra-renal, lupus discoide y lupus eritematoso discoide, alopecia lupus, lupus sistémico eritematoso (SLE), tales como el SLE cutáneo o el SLE cutáneo subagudo, el síndrome de lupus neonatal (LNE) y el lupus eritematoso disseminado, la diabetes mellitus de inicio juvenil (Tipo I), incluida la diabetes mellitus insulino dependiente pediátrica y la diabetes mellitus de inicio en

25 adultos (Diabetes tipo II). También se contemplan respuestas inmunes asociadas con la hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citoquinas y linfocitos T, sarcoidosis, granulomatosis incluyendo granulomatosis linfomatoide, granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitis, incluyendo vasculitis, vasculitis de vasos grandes (incluyendo polimialgia reumática y arteritis de células gigantes (Takayasu)), vasculitis de vaso medio (incluyendo la enfermedad de Kawasaki y la poliarteritis nodosa/periarteritis nodosa, poliarteritis microscópica, la inmunovascúlitis, la vasculitis del sistema nervioso central, la vasculitis cutánea, la vasculitis de hipersensibilidad, la vasculitis necrotizante tal como la vasculitis necrotizante sistémica y la vasculitis asociada a ANCA, tal como la vasculitis o

30 síndrome de Churg-Strauss (CSS) y la vasculitis de vasos pequeños asociada a ANCA, arteritis temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoinmune, anemia positiva de Coombs, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmune incluyendo anemia hemolítica autoinmune (AIHA), enfermedad de Addison, neutropenia autoinmune, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapedesis de leucocitos, trastornos inflamatorios del SNC, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, síndrome de lesión de órganos múltiples tales como los secundarios a septicemia, trauma o hemorragia, enfermedades mediadas por complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad de membrana basal anti-glomerular, síndrome de anticuerpo anti-fosfolípido, neuritis alérgica, enfermedad/síndrome de Behçet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de

35 Reynaud, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide, tales como el penfigoide bulloso y el penfigoide de la piel, el pénfigo (incluido el pénfigo vulgar, el pénfigo foliáceo, el penfigoide de membrana mucosa del pénfigo y el pénfigo eritematoso), poliendocrinopatías autoinmunes, la enfermedad o el síndrome de Reiter, la lesión térmica, la preeclampsia, un trastorno del complejo inmune tal como la nefritis del complejo inmune, nefritis mediada por anticuerpos, polineuropatías, neuropatía crónica tales como polineuropatías de IgM o neuropatía mediada por IgM, trombocitopenia autoinmune o inmunomediada tal como trombocitopenia idiopática púrpura (ITP) incluyendo ITP crónica o aguda, escleritis tales como escleritis ceratoescleritis idiopática, episcleritis, enfermedad autoinmune del testículo y ovario incluyendo orquitis autoinmune y ooforitis, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, enfermedades endocrinas autoinmunes incluyendo tiroiditis tal como tiroiditis autoinmune, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), o tiroiditis subaguda, enfermedad tiroidea autoinmune,

40 hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares tales como síndromes poliglandulares autoinmunes (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), síndromes paraneoplásicos, incluyendo síndromes paraneoplásicos neurológicos tales como síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Eaton-Lambert, síndrome de hombre rígido o de persona rígida, encefalomiелitis, tal como encefalomiелitis alérgica o encefalomiелitis alérgica y encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), miastenia grave tales como miastenia gravis asociada al timoma, degeneración cerebelar, neuromiотonia, opsoclon o síndrome opsoclon mioclon y neuropatía sensorial, neuropatía motora multifocal, síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmune, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, hepatitis de células gigantes, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmune, neumonitis intersticial linfocitaria (LIP), bronquiolitis obliterante (no trasplante) vs NSIP, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Berger (nefropatía IgA), nefropatía IgA idiopática, dermatosis lineal de IgA, dermatosis febril neutrofílica aguda, dermatosis pustular subcorneal, dermatosis acantolítica transitoria, cirrosis tal como cirrosis biliar primaria y neumonocirrosis, síndrome de enteropatía autoinmune, enfermedad celíaca o coeliaca, esprue celíaco (enteropatía gluténica), esprue refractario, esprue idiopático, crioglobulinemia, esclerosis lateral amiotrófica, (ALS; enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad del oído autoinmune tal como la enfermedad del oído interno

45 autoinmune (AIED), pérdida auditiva autoinmune, policondritis tal como la policondritis refractaria o recaída o retardante, proteinosis alveolar pulmonar, síndrome de Cogan/queratitis intersticial no sifilítica, palsy de Bell, enfermedad/síndrome de Sweet, autoinmune rosácea, dolor asociado a zoster, amiloidosis, una linfocitosis no

cancerosa, una linfocitosis primaria, que incluye la linfocitosis monoclonal de células B (por ejemplo, la gammapatía monoclonal benigna y la gammapatía monoclonal de importancia indeterminada, MGUS), neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, canalopatías tales como epilepsia, migraña, arritmia, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica y canalopatías del SNC, autismo, miopatía inflamatoria, glomeruloesclerosis focal o segmentaria o segmentaria focal (FSGS), optalmopatía endocrina, uveoretinitis, corioretinitis, trastorno hepatológico autoinmune, fibromialgia, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes tales como enfermedades desmielinizantes autoinmunes y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Dressler, alopecia greata, alopecia total, síndrome CREST (calcinosis, el fenómeno de Raynaud, la dismotilidad esofágica, la esclerodactilia) y la telangiectasia), infertilidad autoinmune masculina y femenina, por ejemplo, debido a anticuerpos anti-espermatozoos, enfermedad mixta del tejido conectivo, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, pulmón de agricultor, eritema multiforme, síndrome de post-cardiotomía, el síndrome de Cushing, el pulmón del ave-fancier, la angiitis granulomatosa alérgica, la angiitis linfocítica benigna, síndrome de Alport, alveolitis tal como alveolitis alérgica, y alveolitis fribrosante, enfermedad pulmonar intersticial, reacción transfusional, lepra, malaria, enfermedades parasitarias tales como la leishmaniasis, la kyanosomiasis, esquistosomiasis, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, síndrome de Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, endoftalmitis, eritema elevatum et diutinum, eritroblastosis fetal, facitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, flarisis, ciclitis tales como ciclitis crónica, ciclitis heterocónica, iridociclitis (aguda o crónica), ciclitis de Fuch, púrpura de Henoch-Schonlein, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), SCID, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), infección por echovirus, sepsis, endotoxemia, pancreatitis, tioroxicosis, infección por parvovirus, infección por el virus de la rubéola, síndromes post-vacunación, infección por rubéola congénita, infección por virus Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan, insuficiencia gonadal autoinmune, corea de Sydenham, nefritis post-estreptocócica, tromboangitis obliterante, tirotoxicosis, tabes dorsalis, corioiditis, polimialgia de células gigantes, neumonitis de hipersensibilidad crónica, queratoconjuntivitis sicca, queratoconjuntivitis epidémica, síndrome nefrítico idiopático, nefropatía de cambio mínimo, lesión benigna familiar y por isquemia-reperusión, reperusión de órganos trasplantados, autoinmunidad retiniana, inflamación de las articulaciones, bronquitis, enfermedad pulmonar/de las vías respiratorias obstructiva crónica, silicosis, aftas, estomatitis aftosa, trastornos arterioscleróticos, asperniogenesa, hemólisis autoinmune, enfermedad de Boeck, crioglobulinemia, contractura de Dupuytren, endoftalmia facoanafiláctica, enteritis alérgica, eritema nodoso leproso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, enfermedad de Hamman-Rich, pérdida auditiva sensorial, hemoglobinuria paroxística, hipogonadismo, ileitis regional, leucopenia, mononucleosis infecciosa, mielitis transversa, mixedema idiopático primario, nefrosis, oftalmia sinfática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, poliradiculitis aguda, pioderma gangrenoso, tireoiditis de Quervain, atrofia espénica adquirida, timoma no maligno, vitiligo, síndrome de choque tóxico, intoxicación alimentaria, afecciones que implican infiltración de células T, deficiencia de adhesión de leucocitos, respuestas inmunológicas asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citoquinas y linfocitos T, enfermedades que implican diapedesis de leucocitos, síndrome de lesión de órganos múltiples, enfermedades mediadas por complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad de membrana basal antiglomerular, neuritis alérgica, poliendocrinopatías autoinmunes, ooforitis, mixedema primario, gastritis atrófica autoinmune, oftalmía simpática, enfermedades reumáticas, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, síndrome nefrítico, insulinitis, insuficiencia poliendocrina, síndrome poliglandular autoinmune tipo I, hipoparatiroidismo idiopático de inicio en adultos (AOIH), cardiomiopatía tal como cardiomiopatía dilatada, epidermolisis bullosa adquirida (EBA), hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrítico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis purulenta o no purulenta, sinusitis aguda o crónica, sinusitis etmoidal, frontal, maxilar o esfenoidal, trastorno relacionado con eosinófilos, tales como eosinofilia, infiltración pulmonar eosinofilia, síndrome de eosinofilia-mialgia, síndrome de Löffler, neumonía de eosinofilia crónica, eosinofilia pulmonar tropical, aspergiloma broncopneumónico, aspergiloma o granulomas con eosinófilos, anafilaxis, espondiloartritis seronegativas, enfermedad autoinmune poliendocrina, colangitis esclerosante, esclerótica, episclera, candidiasis mucocutánea crónica, síndrome de Bruton, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de ataxia telangiectasia, angiectasia, trastornos autoinmunes asociados con enfermedad del colágeno, reumatismo, enfermedad neurológica, linfadenitis, reducción de la respuesta de la presión sanguínea, disfunción vascular, lesión tisular, isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia renal y enfermedad que acompaña a la vascularización, trastornos hipersensoriales alérgicos, glomerulonefritis, daño por reperusión, trastorno por reperusión isquémico, lesión por reperusión de tejidos miocárdicos u otros tejidos, traqueobronquitis linfomatosa, dermatosis inflamatoria, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, insuficiencia de múltiples órganos, enfermedades ampollasas, necrosis cortical renal, meningitis purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, trastornos inflamatorios oculares y orbitales, síndromes asociados a la transfusión de granulocitos, toxicidad inducida por citocinas, narcolepsia, inflamación grave aguda, inflamación crónica intratable, pielitis, hiperplasia endarterial, úlcera péptica, valvulitis y endometriosis .

VI. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se dan con el propósito de ilustrar varias realizaciones de la invención y no pretenden limitar la presente invención de ninguna manera.

Ejemplo 1

Protección de T1D mediante el tratamiento con nanoesferas recubiertas con péptido/MHC

Protección de la diabetes por tratamiento con nanoesferas super-paramagnéticas recubiertas con monómeros NRP-V7/K^d. Para estudiar si las nanoesferas revestidas con NRP-V7/K^d son tolerogénicas in vivo, se tratarán ratones NOD transgénicos de 8,3-TCR (también denominados ratones 8.3-NOD o Vα17.4 + TCR-TG, más abajo) con varias inyecciones i.v. de un pequeño volumen de nanoesferas (5 µl, que transportaba 0,6 µg de NRP-V7, una vez cada 3 días). Se contempla que los depósitos de linfocitos T CD8⁺ esplénicos reactivos a IGRP₂₀₆₋₂₁₄ transgénicos de alta avididad de estos ratones se agotarán significativamente. También se contempla que las células T CD8⁺ no suprimidas se dinamicen mediante el tratamiento.

Para estudiar la efectividad de la "multiplexación", las nanoesferas se recubren con 6 monómeros peptídicos/MHC diferentes. Las cohortes de ratones NOD de tipo natural se tratan con una agrupación de estas nanoesferas, con nanoesferas recubiertas con un péptido de control (TUM)/K^d, o con nanoesferas recubiertas con NRP-V7/K^d. Se contempla que los ratones NOD tratados con nanoesferas recubiertas con NRP-V7/K^d (una vez cada 2-3 semanas) estarán altamente protegidos contra T1D, mientras que los ratones tratados con nanoesferas no revestidas, nanoesferas revestidas con biotina de avidina, nanoesferas recubiertas con TUM/K^d o péptido NRP V7 solo no estarán protegidas contra T1D.

Expansión sistémica de clonotipos de baja avididad por tratamiento con nanoesferas recubiertas con monómeros NRP-V7/K^d. Se realizaron estudios utilizando nanoesferas radiactivamente marcadas para determinar su distribución tisular. Se contempla que hay una distribución de tejido sistémica a todas las edades de los ratones examinados. Se contempla además que el tratamiento de los ratones con las nanoesferas no conduce a mayores niveles séricos de citocinas resultantes de la estimulación de diversos tipos de células inmunes, incluyendo las células T CD8⁺ reactivas a NRP-V7.

Se cree que los ratones tratados con nanoesferas revestidas con NRP-V7/K^d tienen un aumento significativo de los grupos de células NRP-V7/K^d tetrámero⁺ CD8⁺ intra-islole al final del período de seguimiento (32 semanas), en comparación con los de los animales no diabéticos pareados por la edad tratados con nanoesferas de control. Se contempla además que las células T CD8⁺ intra-islole de los ratones tratados con NRP-V7/K^d-nano esfera se unirán a los tetrámeros NRP-V7/K^d con una avididad significativamente menor (mayor K^d) que los encontrados en los islotes de ratones control, lo que sugiere que el tratamiento con nanoesferas fomentará la expansión de los clonotipos antipatogénicos de baja avididad a expensas de sus contrapartes patógenas de alta avididad de una manera dependiente de la dosis.

Para investigar el reconocimiento y la captación de nanoesferas recubiertas con NRP V7/K/K^d, los inventores evaluaron la presencia de fluorescencia verde (unida a la molécula de avidina del complejo péptido-MHC np) en diferentes subpoblaciones de esplenocitos de ratones NOD que expresan un TCR reactivo a NRP-V7 transgénico así como en ratones NOD no transgénicos naturales. Se contempla que en la inyección de nanoesferas NRP-V7/K^d, la fluorescencia verde sólo se detectará en el subconjunto de células T CD8⁺ de ratones TCR transgénicos y, en menor medida, en el subconjunto de células T CD8⁺ de ratones no transgénicos. Se cree además que no habrá detección de acumulación de fluorescencia verde en los subconjuntos de células esplénicas T CD4⁺, B, CD11b⁺ o CD11c⁺ de cualquier tipo de ratones.

Propiedades anti-diabetogénicas de nanoesferas recubiertas con un complejo de péptido autoantigénico subdominante/MHC (DMK₁₃₈₋₁₄₆/D^b). Los inventores investigaron si los efectos protectores de la vía terapéutica anterior eran una peculiaridad de las células T CD8⁺ reactivas a NRP-V7 (un subconjunto de células T autorreactivas prevalente en ratones NOD), o un fenómeno aplicable a otros, menos especificidades autoantigénicas dominantes. Con este fin, los ratones se trataron con perlas recubiertas con un péptido que se deriva de otro autoantígeno que es presentado por D^b y está dirigido por un grupo mucho más pequeño de células T CD8⁺ autoreactivas diabetogénicas (residuos 138-146 de Distrofia Miotónica Cinasa, DMK, en lo sucesivo denominado "DMK₁₃₈₋₁₄₆/D^{bm}") (Lieberman et al., 2004). Se contempla que el tratamiento de ratones NOD con nanoesferas revestidas con DMK₁₃₈₋₁₄₆D^b causará expansiones significativas de células T CD8⁺ reactivas con DMK₁₃₈₋₁₄₆D^b circulantes, esplénicas e intra-islole y proporcionará una protección significativa contra la diabetes. Se contempla además que la expansión de células T in vivo será específica del antígeno porque las nanoesferas revestidas con DMK₁₃₈₋₁₄₆D^b probablemente no expandirán las células T CD8⁺ reactivas con NRP-V7 y las nanoesferas recubiertas con NRP-V7/K^d probablemente no expandirán las células T reactivas con DMK₁₃₈₋₁₄₆D^b.

Deterioro del reclutamiento de otras especificidades de células T CD8⁺ autorreactivas con IGRP a islotes en ratones tratados con nanoesferas recubiertas NRP-V7/K^d o DMK₁₃₈₋₁₄₆D^b. Los inventores investigarán si el reclutamiento de células T CD8⁺ reactivas con NRP-V7- y/o DMK₁₃₈₋₁₄₆D^b de baja avididad expandida en la nanoesfera impedirá el reclutamiento de otras especificidades de células T autorreactivas de células beta a islotes. Esto se realizará comparando la capacidad de respuesta de las células T CD8⁺ asociadas a los islotes de ratones tratados con control, nanoesferas recubiertas con NRP-V7/K^d- o DMK₁₃₈₋₁₄₆D^b a un panel de 76 epítomos IGRP diferentes, así como DMK₁₃₈₋₁₄₆. Se espera que las células T CD8⁺ asociadas a islotes de ratones tratados con nanoesferas revestidas con NRP-V7/K^d y DMK₁₃₈₋₁₄₆D^b produzcan significativamente más IFN-γ en respuesta a NRP-V7 y

DMK₁₃₈₋₁₄₆, respectivamente, que los aislados de ratones control. Se contempla que habrá reducciones significativas en el número de epítomos capaces de provocar respuestas IFN- γ significativas por las células T CD8⁺ asociadas a los islotes de ratones tratados con nanoesferas revestidas con NRP-V7/K^d o DMK₁₃₈₋₁₄₆D^b, comparadas con las de los ratones tratados con nanoesferas de control, lo que sugiere una alteración del reclutamiento y/o de la acumulación.

Se cree que las nanoesferas revestidas con NRP-V7/K^d y DMK₁₃₈₋₁₄₆/D^b inducirán altas tasas de remisión de la diabetes en ratones NOD recién diabéticos. Se realizaron estudios para investigar la capacidad de la terapia con nanosferas para restaurar la normoglucemia en ratones diabéticos recién diagnosticados. Las cohortes de ratones se monitorizaron dos veces a la semana para niveles de glucosa en sangre y se consideraron hiperglucémicas con una glucosa en sangre $\geq 10,5$ mM. Los ratones se asignaron al azar en ratones que recibían nanoesferas revestidas con TUM/K^d o nanosferas recubiertas con NRP-V7/K^d (dos inyecciones semanales). La mitad de una unidad de insulina subcutánea también se administró una vez al día a los ratones que mostraban glucosuria, para reducir el estrés de las células beta y fomentar la regeneración de las células beta. Otras cohortes de ratones recibieron nanosferas recubiertas de DMK₁₃₈₋₁₄₆/D^b. Se utilizó como control positivo el tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-CD3 (20 μ g/d durante 5 días), que ha demostrado inducir una remisión estable en un porcentaje variable de animales en diferentes estudios. Se contempla que la mayoría de los ratones tratados con nanoesferas revestidas con NRP-V7/K^d se convierten en normoglicémicos a las 5-12 semanas de tratamiento. Del mismo modo, se contempla además que la mayoría de los ratones tratados con nanoesferas revestidas con DMK₁₃₈₋₁₄₆/D^b se convierten en normoglicémicos. Se espera que la mayoría de los ratones que reciben nanoesferas recubiertas de TUM/K^d se desarrollen en hiperglucemia manifiesta.

Para investigar si los efectos del tratamiento en ratones diabéticos eran duraderos, el tratamiento se retiró después de 4 semanas consecutivas de normoglucemia y los ratones se monitorizaron para detectar la recurrencia de la diabetes. Los efectos del tratamiento sobre el tamaño del grupo de tetrámero positivo circulante se evaluaron en la retirada del tratamiento, 4 semanas más tarde y en el momento de la hiperglucemia recurrente. Se contempla que hay una disminución en el tamaño del conjunto de células T reactivas de tetrámero circulante 4 semanas después del cese del tratamiento. En este caso, la reactivación del conjunto de células T autorreactivas de baja avidez expandida, ya sea por autoantígeno endógeno (es decir, en animales pre-diabéticos) como por inyecciones de refuerzo de nanoesferas (es decir, en animales diabéticos con una masa de células beta severamente reducida) puede ser necesaria para la protección a largo plazo.

Se contempla que las pruebas de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) en ratones curados frente a diabéticos y no diabéticos no tratados muestra que los primeros tienen curvas de tolerancia frente a la glucosa casi idénticas a las exhibidas por los animales no tratados sin diabetes y significativamente mejores que las correspondientes a ratones diabéticos. Además, se cree que los animales curados tienen niveles de insulina en suero postprandial que son estadísticamente comparables a los observados en ratones no tratados sin diabetes y significativamente más altos que los correspondientes a los animales no tratados diabéticos.

Investigación de si las nanoesferas recubiertas con péptido/MHC puede efectivamente 'discriminar' entre las células T CD8⁺ autorreactivas de alta y baja avidez. La mayoría de las células CD8⁺ reactivas de IGRP₂₀₆₋₂₁₄ emplean cadenas Val7-J α 42 no variables de CDR3, pero cadenas VDJB heterogéneas. La 'maduración de la avidez' de este subconjunto de células T durante la diabetogénesis se asocia con cambios en el uso de 3 elementos Val7 diferentes. El hecho de que estos 3 elementos V α diferentes proporcionan diferencias en la avidez de unión a ligando (V α 17.5>V α 17.4>V α 17.6) se confirmó en estudios de transfectantes TCR α P que expresaban las 3 cadenas V α 17-J α 42 invariantes de CDR3 diferentes en el contexto de una única cadena TCR β (Han et al, 2005). Para investigar si las nanoesferas revestidas con péptido/MHC pueden de hecho diferenciar células T diana que reconocen el ligando con diferente avidez, se evaluó la capacidad que tienen las nanoesferas revestidos con NRP-V7/K^d de inducir el "taponamiento" de las moléculas CD8 en estos transfectantes. Se contempla que más células V α 17.5⁺ que células V α 17.4⁺ o V α 17.6⁺, formarán taponees a los 5 min de incubación con nanoesferas recubiertas con NRP-V7/K^d. Este resultado indicaría que las nanoesferas revestidas con NRP-V7/K^d pueden de hecho discriminar entre células T de alta y baja avidez y proporcionan una explicación de por qué estas nanoesferas eliminan preferentemente los clonotipos naturales de avidez alta.

Las células CD8⁺ que expresan TCR de V α 17,6/8,3 β de baja afinidad son anti-diabetogénicas. Para investigar si las células T CD8⁺ autorreactivas de baja avidez tenían propiedades anti-diabetogénicas in vivo, el TCR de V α 17,6/8,3 β reactivo con IGRP₂₀₆₋₂₁₄ de baja afinidad se expresó transgénicamente en ratones NOD (denominados en este documento como 'V α 17.6⁺', que tiene una afinidad de ~10 veces inferior a la de 8,3-TCR (V α 17.4⁺), Teyton y Santamaria, datos no publicados). Se ha demostrado que este TCR fomenta la selección positiva de células CD8⁺, pero claramente menos que el 8,3-TCR (V α 17.4⁺) (Han et al., 2005). Como resultado, los ratones V α 17.6⁺ TCR-TG contenían menos timocitos y esplenocitos CD8⁺ reactivos con tetrámeros NRP-V7 que los ratones V α 17.4⁺ TCR-TG. Además, las células CD8⁺ de tetrámero+ (alto y bajo) de ratones TCR-TG de V α 17.6⁺ secretan menos IFN- γ (e IL-2) que las derivadas de ratones V α 17.4 TCR-TG tras la estimulación peptídica in vitro, y son eliminadores ineficientes de las dianas RMA-SK^d pulsadas con NRP-V7, compatibles con su baja avidez para el ligando (Han et al., 2005 y datos no mostrados). Más importante aún, estos ratones están casi completamente protegidos de la diabetes (sólo 2 de 70 mujeres han desarrollado T1D) y la insulinitis [puntuaciones de <0,4 vs >3 (de un máximo de 4) en ratones TCR-TG V α 17.6⁺ vs. V α 17.4⁺, respectivamente (P <0,012)] (Figura 1A y Figura 1B).

Esto está en marcado contraste con lo que ocurre en ratones NOD que expresan un TCR no autoreactivo irrelevante que reconoce un epítipo de LCMV (ratones NOD de TCR-TG de LCMV). Como se ha publicado previamente en Serreze et al. (2001) y se confirma por el uso en la presente invención, estos ratones desarrollan T1D esencialmente como ratones NOD de tipo natural y reclutan células CD8⁺ reactivas a IGRP₂₀₆₋₂₁₄ endógenas a islotes (completamente ausentes en los islotes de ratones Vα17.6⁺ TCR-TG) (Figura 1C). Por lo tanto, a diferencia de Vα17.4⁺ y LCMV TCRs (pro-diabetogénico y neutro, respectivamente), el Vα17.6⁺ TCR parece tener propiedades anti-diabetogénicas.

A pesar de que la mayoría de las células T TG de estos ratones Vα17.6⁺ TCR-TG unen tetrameros débilmente o no los unen en absoluto, una fracción de las células que salen del timo se une al tetrámero con una aparente alta avidéz (es decir, con alta mfi) (Figura 2A). Los inventores sospechaban que las células T CD8⁺ tetrámero-bajo (lo) y tetrámero-negativo de estos ratones proceden de timocitos CD4⁺ CD8⁺ que expresan el TCR TG pero sufren selección positiva en TCR endógenos (es decir, cadenas TCRα). Por otro lado, las células tetrámero-hi se originarían de timocitos CD4⁺ CD8⁺ que sólo expresarían las cadenas TG TCRαβ y, debido a su baja afinidad por péptido/MHC, sólo pueden someterse a selección positiva si expresan niveles más altos de TCR TG que los normales. Esta interpretación está respaldada por la observación de que, en ratones que expresan TCR Vα17.6⁺ en un fondo RAG-2^{-/-}, las únicas células que maduran son aquellas que se unen al tetrámero con alta avidéz (Figura 2B). Es importante destacar que estos dos tipos de ratones TCR-TG RAG-2^{-/-} desarrollan diabetes con una incidencia similar (Figura 3). Por lo tanto, los inventores sospechan que las células T de tetrámero-lo y de tetrámero-CD8⁺ que maduran en ratones RAG-2 + Vα17.6 TCR-TG inhiben el potencial diabetogénico de sus homólogos de tetrámero-hi (que causan la diabetes en ratones RAG^{-/-} TCR-TG). Estos resultados se reprodujeron en existencias de ratones TCR-TG Vα17.6 que portaban una deficiencia endógena de TCR-Cα que excluye la expresión de cadenas TCRα endógenas (es decir, no transgénicas) (Figuras 4A y 4B).

Los ratones TCR-TG Vα17.6⁺ (pero no Vα17.4⁺) generan espontáneamente un grupo de células CD8⁺ de memoria con actividades inmunosupresoras. Los estudios citofluorométricos de las células T CD8⁺ tetrámero-positivas contenidas en los diferentes órganos linfoides de ratones Vα17.6⁺ TCR-TG y ratones Vα17.6 TCR-TG deficientes en TCR-Cα revelaron la presencia de grupos agrandados de células CD44hi y CD44hiCD¹²² CD8⁺ en comparación con ratones TCR-TG Vα17.4 en el bazo, los ganglios linfáticos y, especialmente, la médula ósea, un depósito conocido de células T de memoria (Figuras 5A y 5B). Es importante destacar que esto ocurre principalmente dentro del subconjunto tetramer-bajo, pero no en el subconjunto tetrámero-alto, que no contiene células CD122⁺ (Figura 5C). Estas células expresan los marcadores descritos tanto en linfocitos centrales como en linfocitos de memoria de efectores (Figura 5D), y se encuentran predominantemente en los órganos linfoides periféricos pero no en el timo, lo que sugiere un origen periférico (Figura 5E).

Además, los ensayos de incorporación de BrdU sugirieron que proliferan in vivo (Figura 5F). Funcionalmente, estas células tipo memoria se comportan claramente como células T "de memoria", ya que las células TCR-TG CD8⁺ Vα17.6⁺ (pero no Vα17.4⁺) proliferan vigorosamente en respuesta a IL-2 o IL-15 en ausencia de APC y antígeno (Figura 5G). Además, producen rápidamente IFN-γ tras la estimulación con antígeno in vitro (Figuras 5H y 5I). Sin embargo, no proliferan ni producen interleucina-2 tras la estimulación antigénica in vitro (Figura 5J). Este perfil funcional recuerda mucho al del subconjunto de células T CD4⁺ CD25⁺ reguladoras (supresoras). En conjunto, estos datos sugieren que las células TCR-TG CD8⁺ Vα17.6⁺ (pero no Vα17.4⁺) tienen una mayor capacidad para convertirse en células T de memoria de larga vida (sobre uno o más encuentros con antígenos), presumiblemente capaces de sobrevivir indefinidamente en respuesta a señales homeostáticas, incluso en ausencia de antígeno.

Estas observaciones llevaron a los inventores a sospechar que la "adecuación" homeostática superior de estas células T de baja avidéz de memoria, por otro lado incapaces de matar las células beta, contribuye a su actividad anti-diabetogénica (es decir, proporcionando una ventaja competitiva sobre su mayor avidéz, pero sobre todo clonotipos de cebadores de células beta naturales, y/o inhibiendo su activación). Para evaluar estos últimos, se evaluó la capacidad de las células T TCR-TG CD8⁺ purificadas y CD122⁺ CD122-Vα17.6⁺ por su capacidad para inhibir la proliferación de células T CD8⁺ esplénicas marcadas con CFSE de ratones Vα17.4⁺ TCR-TG NOD. Como se muestra en la FIG. 6, las células T CD8⁺ TCR-TG CD122⁺ (pero no CD122⁻) Vα17.6⁺ inhibieron casi completamente la proliferación de sus contrapartes de células T naturales de mayor avidéz.

En consonancia con la idea de que la reserva espontáneamente expandida de células T CD8⁺ de memoria (CD122⁺) de baja avidéz autoreactivas en ratones TCR-TG NOD Vα17.6⁺ es anti-diabetogénica, el tratamiento sistémico (i.v.) de ratones TCR-TG Vα17.6⁺ y Vα17.4⁺ con DCs pulsadas con NRP-V7, un mAb agonista contra CD40, o un mAb agonista contra 4-1BB (para mejorar la activación/supervivencia de células T CD8⁺), indujo el rápido inicio de la diabetes en ratones Vα17.4 TCR-TG NOD, pero no pudieron provocar enfermedad en ratones Vα17.6⁺ TCR-TG (Tabla 4).

TABLA 3. Los tratamientos que promueven el desarrollo y la expansión de las células T de memoria precipitan el inicio agudo de la diabetes en ratones 17.4α/8.3β-TG NOD, pero no en ratones 17.6α/8.3β-TG NOD.

3 inyecciones de mAb anti-CD40 o mAb Anti-4-1BB 100 µg i.p. con intervalos de 3-4 días 2 inyecciones de 106 DC derivadas de médula ósea activadas con LPS pulsadas con 100 µg/ml de NRP-V7. Se siguieron los ratones para detectar la diabetes al menos 8 semanas después de la última inyección.

La capacidad de las células T CD122⁺ Vα17.6⁺ TCR-TG CD8⁺ para suprimir las respuestas cognadas y no cognadas de las células T diabetogénicas (es decir, dirigidas contra péptidos autoantigénicos distintos del péptido autoantigénico diana de estas células T supresoras IGRP₂₀₆₋₂₁₄), condujo a los inventores a sospechar que podrían afectar su actividad supresora dirigiéndose a las células presentadoras de antígeno (APC). Los ensayos de citotoxicidad (liberación de ⁵¹cromo) que emplean DCs pulsadas con péptidos como células diana y células T CD122⁺ o CD122-Vα17.6⁺ y CD122-Vα17.4⁺ TCR-TG CD8⁺ como efectores indicaron que los primeros, pero no los últimos, eran capaces de lisar específicamente las DC impulsadas por NRP-V7 in vitro (Figura 7A). Los inventores confirmaron que esto también era cierto in vivo. Se transfundió un número igual de células B pulsadas con NRP-V7 y pulsadas con TUM (marcadas con concentraciones bajas o altas del colorante CFSE, respectivamente) en ratones Vα17.6⁺ TCR-TG y Vα17.4⁺ TCR-TG y un día después se sacrificaron a los huéspedes para investigar qué células habían sobrevivido a la transferencia. Como se muestra en la FIG. 7B, mientras que las células B pulsadas con NRP-V7 sólo sobrevivieron en ratones Vα17.4⁺ TCR-TG, las células B pulsadas con el péptido de control negativo TUM sobrevivieron en ambas cepas TCR-TG. Se obtuvieron resultados virtualmente idénticos cuando se usaron DCsm en lugar de células B como APC (Figura 7B). Estos datos sugieren que las células T CD122⁺ Vα17.6⁺ TCR-TG CD8⁺ de baja avidéz suprimen las respuestas de las células T diabetógenas cognadas y no cognadas matando las APC cargadas con autoantígeno.

Investigar si las nanoesferas recubiertas con NRP-V7/K^d inducen la expansión de células CD8⁺ autorreactivas de memoria de baja avidéz (tetrámero-intermedio) en ratones NOD de tipo natural. Se contempla que el tratamiento de ratones NOD con nanoesferas recubiertas con péptido/MHC dará como resultado la desaparición de los clonotipos de alta avidéz y la expansión y el reclutamiento de células T CD8⁺ de baja avidéz, la alteración del reclutamiento de otras especificidades de IGRP epítipo reactivo a islotes y la protección de la diabetes.

Para evaluar si las células T CD8⁺ expandidas en perlas en ratones NOD naturales son células T de memoria de baja avidéz de larga vida, los inventores analizaron la presencia de marcadores de memoria (CD44 y CD 122) en las células T CD8⁺ positivas al tetrámero NRP-V7/K^d contenidas en la médula ósea y el bazo de ratones tratados con nanoesferas recubiertas con NRP-V7/K^d. Se contempla que las poblaciones expandidas de células positivas a los tetrámeros contenidas en el bazo y la médula de estos ratones contenían un porcentaje incrementado de células T CD8⁺ CD44hi y CD44hiCD122⁺, lo que sugiere que el tratamiento con nanoesferas NRP-V7/K^d aumenta el tamaño de las agrupaciones de células T de tetrámero⁺ CD44hi y tetrámero⁺ CD44hiCD 122⁺.

Se contempla que las células T tipo memoria que se expanden mediante terapia in vivo con nanoesferas revestidas con NRP-V7/K^d se comportarán como las células T CD8⁺ de memoria CD122⁺ Vα17.6⁺ TCR-TG que se acumulan espontáneamente en ratones Vα17.6⁺ TCR-TG: no producen IL-2 ni proliferan, pero producen altos niveles de IFN-γ en respuesta a la estimulación antigénica in vitro. Se contempla adicionalmente que, tras la activación con mAb anti-CD3 e IL-2, estas células T tipo memoria suprimirán eficazmente la proliferación de la respuesta del marcador CFSE de las células T CD8⁺ Vα17.4⁺ TCR-TG in vitro.

Las nanoesferas recubiertas con péptido/MHC expanden las células T de memoria de baja avidéz preexistentes. Se cree que las nanoesferas revestidas con péptido/MHC no generarán células T de memoria de novo, sino que expandirán las agrupaciones preexistentes de células T de memoria. Se contempla que el tratamiento de ratones NOD con nanoesferas revestidas con TUM/K^d no inducirá la expansión sistémica de células T CD8⁺ reactivas a TUM. Se contempla además que el tratamiento de ratones B10.H2g7 con nanoesferas revestidas con NRP-V7/K^d no induce una expansión significativa del subconjunto de células T CD8⁺ tetrámero⁺ NRP-V7/K^d en todos los órganos linfoides y la expansión sistémica de las células T CD8⁺ reactivas con tetrámeros en ratones NOD tratados con nanoesferas son significativamente más eficaces cuando se inician en el inicio de la diabetes que en la etapa pre-diabética. También se cree que, a diferencia de las células T CD8⁺ naturales, que tienden a sufrir apoptosis tras la ligadura de TCR en ausencia de co-estimulación, las células T CD8⁺ de memoria son independientes de la coestimulación para el crecimiento.

Para investigar la hipótesis anterior formalmente, los inventores determinaron si las nanoesferas recubiertas con IGRP₂₀₆₋₂₁₄/K^d pueden expandir células T CD8⁺ reactivas a IGRP₂₀₆₋₂₁₄/K^d en una cepa NOD dirigida por gen que expresa una forma mutante de IGRP en la que los dos residuos en contacto con TCR de IGRP₂₀₆₋₂₁₄ han sido sustituidos por alaninas (K209A y F213A). Los alelos diana (en este documento en adelante denominados FLEX1 o NOD.IGRPK_{209A/F213A}^{KI/KI}) son retrocruzados sobre el fondo NOD (desde 129) usando el enfoque de velocidad-congénica, para asegurar la homocigosidad de los alelos NOD en todos los loci Idd. Debido a que las células T CD8⁺ que maduran en estos ratones dirigidos por genes nunca se exponen a IGRP₂₀₆₋₂₁₄ in vivo, estos ratones no pueden generar espontáneamente células T CD8⁺ IGRP₂₀₆₋₂₁₄/K^d reactivas. A pesar de que estos ratones desarrollan tanto diabetes como insulinitis (no mostrada), sus linfocitos T CD8⁺ asociados a islotes reconocen epítipos en IGRP, pero están completamente desprovistos de clonotipos CD8⁺ IGRP₂₀₆₋₂₁₄-reactivos. Se contempla que los ratones NOD homocigóticos FLEX1 tratados con dosis óptimas de nanoesferas recubiertas con IGRP₂₀₆₋₂₁₄/K^d no contendrán agrupaciones expandidas de células T CD8⁺ IGRP₂₀₆₋₂₁₄/K^d reactivas en sus órganos linfoides. Esto sugiere que las nanoesferas recubiertas con péptidos/MHC expanden depósitos preexistentes de células T de memoria con propiedades supresoras y no pueden generar células T de memoria de novo.

Dado que los clonotipos de baja avidéz (es decir, en ratones Vα17.6⁺ TCR-TG) parecen ser más eficientes en la generación de progenie de células T de memoria que sus homólogos de alta avidéz (es decir, en ratones Vα17.4⁺

TCR-TG) durante la diabetogénesis, se cree que las nanoesferas recubiertas con péptido/MHC trabajan induciendo la supresión de clonotipos de alta avidez naturales y la expansión de pequeños grupos de clonotipos de baja avidez preexistentes de memoria.

Ejemplo 2

- 5 Prueba de la capacidad de las nanoesferas de óxido de hierro recubiertas con los complejos humanos de péptido/HLA relevantes de diabetes tipo 1 para restaurar la normoglucemia

Ratones "humanizados" que expresan transgenes HLA y complejos péptido/HLA disponibles para los estudios propuestos. Como se mencionó anteriormente, los péptidos derivados de insulina e IGRP son dianas primarias de células T CD8⁺ en ratones NOD de tipo natural. La evaluación de péptidos que presentaron moléculas de MHC humanas (antígenos de leucocitos humanos, HLA) derivados de estos dos autoantígenos durante la diabetogénesis se está investigando en ratones NOD transgénicos HLA 'humanizados'. Los estudios se centraron inicialmente en HLA-A*0201, una molécula del MHC que se expresa en casi el 50% de ciertos grupos étnicos. Este estudio emplea la cepa denominada NOD.β2 m^{null}.HHD, que carece del gen de la macroglobulina β2 murina y expresa la construcción monocadena quimérica HHD (Pascolo et al., 1997). Este constructo codifica β2m humano unido covalentemente a los dominios α1 y α2 de HLA-A*0201 humano y a los dominios α3, transmembrana y citoplásmico de H-2D^b murino. Aunque la cepa expresa sólo HLA-A*0201, y no moléculas de MHC de clase I murina endógena, es susceptible a la diabetes, con 55% de las hembras afectadas por 30 semanas de edad (Takaki et al, 2006). Dos epítomos de IGRP humano (hIGRP₂₂₈₋₂₃₆ e hIGRP₂₆₅₋₂₇₃) que se unen a HLA-A*0201 son reconocidos por células T CD8⁺ asociadas a islotes de estos ratones y células T CD8⁺ aisladas de los islotes de ratones NOD.β2 m^{null}.HHD. son citotóxicos para los islotes positivos de HLA-A*0201 humanos (Takaki et al, 2006). Los tetrámeros péptidos/HLA-A*0201 se prepararon usando uno de estos péptidos. Para facilitar la unión de estos tetrámeros por moléculas CD8 murinas, el dominio α3 (unión a CD8) del complejo HLA-A*0201 se reemplazó con el de la molécula H-2 K^b murina. Los resultados de estos estudios han establecido la utilidad de estos ratones para la identificación de células T restringidas con HLA-A*0201 y autoantígenos de células beta de importancia potencial para la T1D humana (Takaki et al., 2006). Basándose en la descripción actual, se pueden identificar los péptidos humanos que están dirigidos por células T restringidas a HLA-A*0201 de pacientes con T1D. Además, los inventores han generado ratones NOD que expresan HLA-A*1101, HLA-B*0702 o HLA-Cw*0304. Estos ratones también tienen β2m murino sustituido con β2m humano cruzándolos con la cepa NOD.β2 m^{null}.hβ2m (Hamilton-Williams et al, 2001). Los tres transgenes HLA expresan bien, y las tres cepas HLA-transgénicas son susceptibles a la diabetes. En conjunto, los HLA de estos animales "humanizados" son representativos de los cuatro supertipos de HLA HLA-A2, HLA-A3, HLA-B7 y HLA-C1, respectivamente (Sidney et al., 1996; Doytchinova et al., 2004). Las frecuencias genéticas de los alelos HLA-A*1101, HLA-B*0702 o HLA-Cw*0304 pueden alcanzar 23%, 11% o 10%, respectivamente, dependiendo del grupo étnico examinado (Cao et al, 2001). La cobertura de la población puede ser superior al 90%, dependiendo del grupo étnico considerado, cuando los cuatro supertipos son dirigidos (Sidney et al, 1996; Doytchinova et al, 2004; Cao et al., 2001). Esta consideración es significativa con respecto a la traducción de estos estudios a seres humanos. Estos animales, así como la cepa el NOD.β2m^{null}.HHD anteriormente descrita están disponibles para estudios posteriores.

En este ejemplo, los inventores proponen un diseño sobre cómo traducir estas observaciones en ratones NOD de tipo natural a ratones NOD transgénicos HLA 'humanizados'. El objetivo es investigar si el tratamiento con nanoesferas recubiertas con varios complejos peptídicos/HLA diferentes dirigidos a grupos de células T CD8⁺ autoreactivas relevantes para la T1D humana puede proteger a los ratones contra la diabetes así como restaurar la normoglucemia en sus contrapartes recién diagnosticadas. Aquí, los inventores presentan un enfoque de traducción para identificar las combinaciones de péptidos/HLA relevantes de T1D para su uso en la T1D humana. Específicamente, los inventores contemplan que las nanoesferas revestidas con diferentes complejos de péptidos autoantigénicos/ HLA-A*0201 relevantes para la T1D permitirán la protección contra la diabetes y curarán la T1D en ratones NOD.β2m^{null}.HHD (que expresan HLA-A*0201). Cualquier experto en la técnica puede usar esta descripción para usar con otros epítomos relacionados con otras enfermedades autoinmunes, usando composiciones y métodos similares a los usados con epítomos de insulina y/o IGRP presentados por otras moléculas HLA en ratones transgénicos HLA 'humanizados' frente a células CD8⁺ asociadas a islotes, para incluir otras composiciones y métodos. Cualquier experto será capaz de identificar las condiciones mínimas de tratamiento y el tipo de complejos péptido/HLA que proporcionarán los máximos beneficios terapéuticos, así como el requisito de existencia pre-terapéutica de células T CD8⁺ de baja avidez de memoria para el tratamiento terapéutico de éxito y la identificación de combinaciones adicionales de péptidos/HLA cubriendo a tantas personas en diferentes grupos étnicos como sea posible.

55 Síntesis de nanoesferas. Las nanoesferas se sintetizan y caracterizan en los niveles físico y químico esencialmente como se describió previamente (Moore et al., 2004), pero utilizando monómeros de péptido biotinilado/HLA-A*0201. La molécula de MHC del complejo está compuesta de β2 microglobulina humana y una forma quimérica de HLA-A*0201 humana en la que sus dominios α1 y α2 están fusionados al dominio α3 de H-2 K^b murino (para facilitar el reconocimiento por la molécula CD8 murina). Como péptidos autoantigénicos se utilizan diferentes derivados de insulina y IGRP (tales como, por ejemplo, hIns_{B10-18}, hIGRP₂₂₈₋₂₃₆ y hIGRP₂₆₅₋₂₇₃) que han demostrado ser reconocidos por células T CD8⁺ asociadas a islotes en el contexto de HLA-A*0201. Los monómeros de péptidos biotinilados/HLA-A*0201 se añadirán a una relación molar de 4 moles de biotina por mol de avidina. Las proteínas

biotiniladas se añadirán en múltiples porciones (aproximadamente 0,4 moles de biotina por avidina) durante un período de 24 horas a 4°C con agitación lenta (10 rpm). Las sondas resultantes se purifican en una columna de separación magnética (Milteny Biotec). Un monómero consistió en un péptido de unión no relacionado HLA-A*0201, complejo con moléculas de HLA-A*0201, para la síntesis de la sonda de control negativo. Se miden el tamaño de la nanoesfera, la relajabilidad (cambio en la velocidad de relajación por mM), el número de sitios de unión a la biotina y el contenido de hierro y proteína.

Administración de nanoesferas. Cohortes de 10-15 ratones NOD.β2m^{null}.HHD hembra se trataron con nanoesferas recubiertas con cada uno de los diferentes complejos de péptido/HLA mencionados anteriormente o un complejo de péptido de control negativo (gripe)/HLA (0,01, 0,05, 0,1, 0,5 y 1 µg de equivalentes peptídicos, una dosis cada 3 semanas de 4 a 30 semanas de edad, o dos dosis/semana a partir de las 10 semanas de edad durante 5 semanas consecutivas). La expansión periférica de células T CD8⁺ específicas de antígeno se documenta mediante la tinción de células mononucleares de sangre con anticuerpos monoclonales anti-CD8 y tetrámeros de péptidos/MHC (antes del inicio del tratamiento y en la retirada del tratamiento). Los ratones se sacrifican al inicio de la hiperglucemia o al final del estudio. Los ratones individuales se estudian mediante citometría de flujo multicolor para detectar la presencia de células T CD8⁺ tetrámero⁺ central y/o de memoria efectoras (CD69⁺, CD44^{hi}, CD62L^{hi} o CD62L^{lo}, CD122⁺, Ly6C⁺) en diferentes órganos linfoides (bazo, ganglios linfáticos), médula ósea (un reservorio conocido de células T de memoria), hígado, pulmón e islotes. La avidéz de unión al tetrámero se mide como se ha descrito (Han et al., 2005; Amrani et al., 2000). Los inventores contemplan que el tratamiento induce la expansión sistémica de células de tetrámero⁺ CD8⁺ central de baja avidéz y de memoria efectoras y la acumulación preferente (pero no exclusiva) de estas células T en la médula ósea, los ganglios linfáticos pancreáticos (PLN) y los islotes.

Administración de múltiples dosis del complejo péptido/MHC. En otro estudio, las cohortes de ratones se tratan con una, dos, tres o cuatro inyecciones de una dosis eficaz, que los inventores consideran similares para todos los complejos que muestran eficacia terapéutica en otros estudios (a las 4, 7, 10 y 13 semanas). Se espera que la protección requiera una o más de una dosis (para expandir el depósito de células T de baja avidéz de memoria por encima del umbral protector) y que la población de linfocitos T de memoria de tetrámero⁺ CD8⁺ expandida desaparezca progresivamente de la circulación para acumularse en médula, PLN e islotes.

Administración de complejos péptido/MHC al inicio de la hiperglucemia. Los ratones se tratan al comienzo de la hiperglucemia (> 10,5 mM/l) con un protocolo de tratamiento de nanoesferas más agresivo (1-5 µg de equivalentes peptídicos dos veces por semana durante 5 semanas). Los controles negativos y positivos recibirán nanoesferas recubiertas con un complejo péptido/HLA irrelevante o mAb anti-CD3 (una inyección i.v. diaria de 20 µg durante 5 días (Haller, 2005)), respectivamente. A los ratones se les extrae sangre inmediatamente antes del inicio del tratamiento para evaluar los porcentajes basales de células T CD8⁺ positivas a los tetrámeros en la circulación. Se considera la reversión de T1D cuando los valores de glucosa en sangre se estabilizan en <10 mM/l durante al menos 4 semanas, momento en el cual se retira el tratamiento. A los ratones se les extrae sangre de nuevo para confirmar la presencia de grupos significativamente expandidos de células T CD8⁺ positivas a los tetrámeros circulantes. Los animales son seguidos durante al menos 8-12 semanas adicionales para asegurar una remisión estable. Los ratones se sacrifican al final del período de observación para establecer la persistencia a largo plazo de las agrupaciones expandidas de células T CD8⁺ positivas a tetrámeros de memoria en diferentes órganos linfoides y no linfoides. El tejido pancreático también se cultiva para el análisis histológico. Se espera que la remisión a largo plazo este asociada con la presencia de numerosos pequeños islotes desprovistos de infiltración de células mononucleares. Es decir, a diferencia de la situación en ratones pre-diabéticos, donde se espera que el tratamiento fomente la ocupación de islotes inflamados por células T de memoria protectora, se predice que los tratamientos en ratones diabéticos promoverán la acumulación de células T de memoria protectora en los ganglios linfáticos pancreáticos (además de otros depósitos de células T de memoria), pero no en islotes (presumiblemente, islotes de recién nacidos que carecen de potencial inflamatorio).

Las nanoesferas revestidas con péptido/HLA actúan induciendo la delección de clonotipos naturales de alta avidéz. Los inventores contemplan que las células T CD8⁺ autorreactivas de baja avidéz tienden a acumularse como células de memoria durante la progresión de T1D (en pequeños números) y que las nanoesferas revestidas con péptido/HLA actúan induciendo la supresión de clonotipos de alta avidéz naturales (debido al desencadenamiento de TCR sin coestimulación) y la expansión de pequeñas agrupaciones de clonotipos de baja avidéz de memoria preexistentes (independientes de la coestimulación). En parte, esto se debe a la observación de que el tratamiento de ratones con un péptido irrelevante (de un complejo antigénico tumoral (TUM/H-2 K^d)) no indujo la expansión periférica de células T CD8⁺ TUM/K^d reactivo-tetrámero sobre el fondo (véase más arriba). Estas células CD8⁺ autorreactivas de baja avidéz de memoria inhiben entonces la activación de sus contrapartes naturales de alta avidéz (presumiblemente menos ajustadas) compitiendo por recursos estimuladores (es decir, antígeno/MHC en DCs, citoquinas, etc.). De hecho, hay pruebas en otros sistemas de que las células de memoria pueden competir eficazmente con células T naturales para señales homeostáticas (es decir, IL-15) (Tan et al., 2002). Al establecer contactos estables con DCs autoantigénicamente cargadas en los PLN, estos clonotipos de baja avidéz de memoria prevalente también inhibirían la activación de otras especificidades de células T autorreactivas.

La manifestación de la expansión de las células T (y la actividad anti-diabetogénica) de las nanoesferas recubiertas con péptido/HLA requiere la expresión del autoantígeno diana endógeno en las células beta. Se cree que la expresión de autoantígenos diana endógenos es la fuente del estímulo que induce la formación de las agrupaciones

de células T CD8⁺ autorreactivas de baja avidez de memoria que se expanden posteriormente mediante el tratamiento con nanoesferas. Una deficiencia de IGRP se introducirá en ratones NOD.β2m^{null}.HHD. Estos ratones se tratan con nanoesferas revestidas con hIGRP₂₂₈₋₂₃₆ (reactivo cruzado con mIGRP₂₂₈₋₂₃₆) y hIGRP₂₆₅₋₂₇₃ (idénticas a mIGRP₂₆₅₋₂₇₃)/HLA-A*0201 (Takaki et al., 2006). Los ratones NOD.β2m^{null}.IGRP^{null}.HHD se tratan con dosis óptimas de nanoesferas cubiertas con los dos complejos IGRP/HLA. Los inventores contemplan que el tratamiento no induce la expansión/reclutamiento de las células CD8⁺ correspondientes de péptido hIGRP/HLA.

Si la expresión de IGRP es dispensable para el desarrollo de la diabetes (se sabe que la falta de expresión de IGRP no es letal, ya que las ratas no lo expresan) y los ratones desarrollan espontáneamente diabetes, también se predice que el tratamiento con nanosferas no protegerá a los ratones de T1D (no habrá células T CD8⁺ de memoria IGRP reactivas). Por el contrario, se cree que el tratamiento con nanoesferas revestidas con complejos de HLA-A*0201 y epítomos de insulina inducirá la expansión de las correspondientes agrupaciones de células T de memoria y será protector, ya que los ratones seguirán expresando insulina.

Es posible que los tipos de nanoesfera que se prueban en esta invención no induzcan expansiones de células T significativas en todos los ratones. Esto probablemente dependerá de si la población de células T correspondiente se ha sometido previamente a cebado in vivo antes del inicio del tratamiento. Puede ser útil/necesario estudiar cohortes adicionales de ratones tratados con combinaciones de varios tipos diferentes de nanoesferas. Obviamente, es concebible que, contrariamente a la predicción de los inventores, el tratamiento con nanoesferas pueda inducir la formación de novo de reservas de células T de baja avidez de memoria. En este caso, sin embargo, los inventores contemplan que estas células no serán protectoras porque no serán capaces de acoplar complejos IGRP/HLA-A*0201 endógenos en DCs en ratones NOD.β2m^{null}.IGRP^{null}.HHD.

Ratones que expresan hIGRP. Los inventores han generado varias líneas de ratones que expresan un transgén de IGRP humano impulsado por promotor de insulina de rata y han comparado los niveles de expresión del transgén humano en cada una de estas líneas con el del locus codificante de mIGRP endógeno mediante RT-PCR en tiempo real. Aunque los niveles de expresión del transgén eran altamente variables de una línea a otra, los niveles de expresión eran consistentes entre diferentes individuos dentro de líneas individuales. En una de estas líneas (N° 1114) los niveles de expresión de hIGRP eran equivalentes a los de mIGRP.

Los inventores introdujeron este transgén RIP-hIGRP en ratones NOD.β2m^{null}.IGRP^{null}.HHD y hβ2m/HLA-A*101, HLA-B*0702, o ratones NOD.β2m^{null}.IGRP^{null} HLA-Cw*0304-transgénico, para identificar epítomos adicionales en hIGRP que son los objetivos de las respuestas de las células T CD8⁺ en el contexto de estos cuatro alelos HLA diferentes. Las células T CD8⁺ asociadas a los islotes de estos ratones se seleccionan en busca de reactividad contra bibliotecas de péptidos hIGRP de unión a HLA-A*0201, HLA-A*1101, HLA-B*0702 y HLA-Cw*0304.

Las correspondientes nanoesferas recubiertas de péptido/complejo de HLA se ensayan entonces en cuanto a la eficacia anti-diabetogénica en los ratones NOD.β2m^{null}.IGRP^{null} HLA-A*1101, HLA-B*0702 o HLA-Cw*0304 transgénicos correspondientes. El objetivo general de este ejercicio es ampliar el repertorio de combinaciones de péptidos/HLA que podrían utilizarse para tratar al mayor número posible de pacientes.

Optimización de las propiedades terapéuticas de NP y conjugación de pMHC. Los estudios en curso utilizando complejos pMHC clase I se realizaron para optimizar el tamaño de NP y la densidad, así como la valencia de pMHC. Esto se hizo utilizando NP de oro, ya que es más susceptible a este tipo de estudios que el óxido de hierro. Esto también ha ayudado a demostrar que la capacidad de pMHC-NP para expandir la memoria de células T autorreguladora es independiente de la composición química del núcleo NP (óxido de hierro vs. oro). Se realizó un extenso trabajo con NP de oro de diferentes diámetros y los datos sugieren que las NP de <14 nm de diámetro son beneficiosas a lo largo de las líneas que apuntan a un menor tamaño como el tamaño óptimo de NP. La unión direccional de múltiples pMHCs a la superficie NP (> 50-200/NP) a través de su terminal carboxi y la estabilización adecuada de los NPs recubiertos para permitir la concentración a altas densidades de partículas (> 10¹⁰/uL) sin comprometer la monodispersión de las NPs o la estabilidad. Al probar estas nanovacunas de clase I en ratones NOD pre-diabéticos, se ha establecido un intervalo viable de dosis de NP y valencia de pMHC que permite una expansión significativa de células T CD8⁺ autoregulatorias cognadas in vivo (~10 a 20 veces). Se ha establecido que la dosis total de pMHC es clave y que los mejores resultados se obtienen al dar un mayor número de pequeñas NPs recubiertas con menos pMHCs que un número menor de NPs mayores recubiertas en mayores valencias de pMHC (para la misma cantidad de pMHC total). Estas condiciones también reducen la acumulación de tejidos y permiten la administración de niveles terapéuticos de pMHC a las dosis más bajas posibles de metal.

En una realización preferida, se usan regímenes de dosificación basados en las siguientes suposiciones:

Suposiciones: nanopartícula de óxido de hierro de 4 nm revestida con antígeno pMHC en una densidad suficiente para que la cantidad total de proteína por dosis sea de aproximadamente 1 µg a 25 µg.

Por ejemplo, el pMHC total por dosis (1 µg-25 µg) = (1,34 x 10¹³ pMHC/dosis a 3,33 x 10¹⁴ pMHC/dosis)

Total de hierro por dosis (4nm) NPs

(1 µg-5 µg) = (3,73x10¹² Nps/dosis a 5,60x10¹³ Nps/dosis)

Se entiende que la cantidad de pMHC por dosis puede oscilar desde tan bajo como 0,1 µg hasta 500 µg.

Como ejemplo, en un paciente humano de 60 kg, la cantidad de pMHC por dosis puede variar de 0,24 a 6,08 mg con la lógica de que esto corresponde a los 1 µg a 25 µg descritos anteriormente. También como se ha indicado anteriormente, esta dosis se puede cambiar para corresponder a 0,1 µg a 500 µg.

- 5 Las partículas de óxido de hierro de 4 nm descritas anteriormente proporcionan una eficacia de mejora relativa a nanopartículas de oro que tienen un diámetro de 14 nm, lo que sugiere que las partículas más pequeñas tienen una utilidad mejorada. Se entiende que la expresión "óxido de hierro" pretende abarcar todos los óxidos de hierro disponibles o conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, a modo de ejemplo, oxihidróxidos de hierro.

Ejemplo 3

10 Nanosferas monospecíficas revestidas de péptido-MHC Clase II

- Producción de complejos de pMHC clase II de T1D. Con el fin de probar la hipótesis de que las nanoesferas recubiertas con complejos de péptido relevante a T1D/I-A⁹⁷ también podría permitir la protección de T1D y curar la T1D en ratones NOD, se pueden construir varios complejos péptido/IA⁹⁷ diferentes a partir de las siguientes cinco secuencias peptídicas relevantes de T1D y de control: mimotopo BDC2.5: AHHPIWARMMDA (SEQ ID NO: 59); IGRP₁₂₈₋₁₄₅: TAALSYTISRMEESSVTI (SEQ ID NO: 60); IGRP₄₋₂₂: LHRSGVLIHHLQEDYRTY (SEQ ID NO 61); IGRP₁₉₅₋₂₁₄: HTPGVHMASLSVYLKTNVFL (SEQ ID NO: 62); y la insulina B₉₋₂₃: SHLVEALYLVAGERG (SEQ ID NO 63). Como controles negativos, el complejo de péptido de isomerasa G6P (LSIALHVGFDH; SEQ ID NO 64)/IA⁹⁷ (control pMHC propio) y dos lisozimas de huevo de gallina (HEL₁₄₋₂₂-RHGLDNYRG; SEQ ID NO 65- y HEL₁₁₋₂₅-AMKRHGLDNYRGYSL; SEQ ID NO. 66-)/I-A⁹⁷ (controles pMHC extraños). Los monómeros I-A⁹⁷ recombinantes se generan como se ha descrito anteriormente. En resumen, las construcciones finales en el vector pRMHa3 codifican las secuencias líder naturales, seguidas por las secuencias peptídicas descritas anteriormente, y los dominios extracitoplasmáticos de las cadenas I-A⁹⁷ a y b, respectivamente. Ambas cadenas se extienden en una secuencia enlazadora (SSAD), un sitio de escisión de trombina (LVPRGS) y una secuencia de cremallera de leucina ácida o básica para la cadena a y la cadena b, respectivamente, seguidas por seis residuos consecutivos de histidina. Una secuencia de biotinilación N° 85 sigue la cremallera ácida en la cadena a. Las construcciones de ADN se cotransfectan en células de *Drosophila melanogaster* SC2 junto con un gen de resistencia a puromicina para generar líneas celulares estables. Para la preparación a gran escala (12 litros), las proteínas recombinantes se cosechan por flujo tangencial de sobrenadantes de células inducidas por CuSO₄ y se purifican mediante cromatografía de afinidad de quelatos metálicos, cromatografía de intercambio aniónico, así como cromatografía de exclusión por tamaños. La biotinilación de moléculas purificadas se realiza utilizando la enzima BirA. La biotinilación se mide mediante inmunodepleción en perlas de estreptavidina-agarosa y posterior análisis por SDS-PAGE. Estos complejos pueden conjugarse con las nanoesferas biodegradables y bioabsorbibles. Estos monómeros también se pueden usar para producir tetrámeros conjugados con fluorocromos para enumerar las células T CD4⁺ autoreactivas conocidas, tanto antes como después del tratamiento con nanoesferas recubiertas con pMHC. Los complejos pMHC biotinilados purificados se pueden recubrir entonces sobre las nanoesferas. Para los estudios propuestos en este documento, se pueden producir los complejos pMHC recombinantes en células de mosca, como anteriormente, pero utilizando un diseño de construcción diferente que aumente la valencia total de pMHCs que se pueden recubrir sobre nanoesferas individuales: dímeros de pMHC fusionados al Fc de IgG2a.

Optimización de las propiedades terapéuticas de las nanoesferas y conjugación de pMHC.

- 40 Se pueden hacer estudios usando pMHC clase I complejos para optimizar el tamaño de la nanoesfera y la densidad, así como la valencia de pMHC. El tamaño, la densidad, la carga y la monodispersidad de las nanoesferas pueden medirse mediante espectrofotometría, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y dispersión dinámica de la luz. Las muestras de nanoesferas pueden concentrarse, conjugarse con tiol-PEG-NH₂-pMHCs de 3,4 kDa, lavarse y concentrarse a altas densidades (~ 10¹⁴/ml) sin comprometer la monodispersión.
- 45 Se contempla que las nanoesferas de 5-15 nm de diámetro son óptimas. Nuevos protocolos de síntesis permitirán la unión direccional de múltiples pMHCs a la superficie de la nanoesfera (hasta 200/nanosfera, por ejemplo) a través de sus terminales carboxílicos y una adecuada estabilización de la nanoesfera recubierta para permitir la concentración a densidades de partículas altas (> 10¹⁰/uL) sin comprometer la monodispersión o la estabilidad. Estas nanovacunas de clase I se pueden probar en ratones NOD pre-diabéticos para establecer un intervalo viable de dosis de nanoesfera y valencia de pMHC que permita la expansión masiva de células T CD8⁺ autoregulatorias cognadas in vivo. Se contempla que el tratamiento de ratones diabéticos recién diagnosticados con estas nanoesferas de pMHC será altamente eficaz para restablecer la normoglucemia. Se contempla que se obtendrán los mejores resultados cuando se dé un mayor número de pequeñas nanoesferas recubiertas con menos pMHC que un número menor de nanoesferas mayores revestidas con mayores valencias de pMHC (para la misma cantidad de pMHC total). Se contempla además que estas condiciones y las propiedades bioabsorbibles y biodegradables de las nanoesferas reducirán la acumulación de tejido y permitirán el suministro de niveles terapéuticos de pMHC a la dosis más baja posible.

Reversión de la hiperglucemia en ratones NOD por tratamiento con las nanoesferas revestidas con pMHC de clase II

que son relevantes para T1D. Se contempla que las nanoesferas bioabsorbibles y biodegradables revestidas con pMHC clase II pueden revertir la hiperglucemia en ratones NOD diabéticos recién diagnosticados, esencialmente como se describe para las nanoesferas revestidas con pMHC de clase I. Los ratones NOD diabéticos se pueden tratar dos veces por semana con 7,5 µg de NPs. Los ratones se consideran curados cuando permanecen normoglicémicos durante 4 semanas consecutivas. Se contempla que las nanoesferas de 2,5mi/I-A^{g7} invertirán la hiperglucemia en casi todos los ratones ensayados. La hiperglucemia puede medirse, por ejemplo, mediante pruebas de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT). Se contempla que la mayoría, si no todos los ratones hiperglicémicos tratados con nanosferas de IGRP₁₂₈₋₁₄₅/I-A^{g7}, nanosferas de B₉₋₂₃/I-A^{g7} y nanosferas de IGRP₄₋₂₂/I-A^{g7} se volverán normoglicémicos. Como control, se pueden usar nanoesferas recubiertas con nanosferas de IGRP₂₈₂₋₂₉₂/I-A^{g7} (un antígeno propio irrelevante para T1D) y HEL₁₄₋₂₂/I-A^{g7} (se puede usar un antígeno ajeno). Se contempla que estos experimentos demostrarán que las nanoesferas "monoespecíficas" recubiertas con varios complejos de clase II de pMHC diferentes relevantes para T1D pueden ser al menos tan eficaces en la inducción de la inversión de T1D como nanoesferas revestidas con pMHC de clase I. En algunos casos, se cree que podría ser necesario reforzar el mantenimiento coherente y universal a largo plazo de la normoglucemia

Nanoesferas revestidas con pMHC clase II T1D-relevantes y la expansión de células T CD4⁺ tipo Tr1 cognados y autoregulatoras de fenotipo de memoria. Se contempla que la sangre, los bazo, los ganglios linfáticos pancreáticos (PLN), los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y la médula ósea de ratones diabéticos de 50 semanas de edad que puedan ser normoglicémicos por tratamiento con nanoesferas de <2,5mi/I-A^{g7} revelan un porcentaje significativamente mayor de células T CD4⁺ tetrámero+ 2.5mi/I-A^{g7} en todos los órganos examinados, excepto los MLN, en comparación con los ratones estudiados inmediatamente al inicio de la diabetes o los animales no tratados no diabéticos coincidentes en la edad. Se cree que la expansión de las células T CD4⁺ será específica del antígeno y no se detectará expansión en las agrupaciones de células T CD4⁺ autoreactivas no cognadas. Se contempla que el mantenimiento de la expansión de células T autorregulatoras será necesaria para el mantenimiento sostenido de la normoglucemia. Los análisis fenotípicos de estas células de tetrámero+ 2.5mi/I-A^{g7} expandidas en NP-2 vs. 2.5mi/I-A^{g7} pueden revelar un fenotipo de tipo memoria (sobre-regulación CD62^{low}, CD44^{hi} y CD69 moderada). Estas células pueden ser CD25- y FoxP3-. Esto puede confirmarse en ratones NOD que expresan FoxP3-eGFP, en el que las células Treg constitutivamente expresan eGFP. El tratamiento de estos ratones a las 10 semanas de edad con las nanoesferas 2.5mi/I-A^{g7} puede expandir las células T eGFP - 2,5 mi tetrámero+ CD4⁺. Los estudios funcionales in vitro de células T CD4+tetrámero+2.5mi/I-A^{g7} fijadas por FACS pueden determinar si proliferan en respuesta a DCs pulsadas con péptido cognado, pero no no afín, y si secretan IL-10 e IFN γ . Estos estudios se pueden realizar utilizando tecnología ELISA y luminex. Se contempla que estas células T CD4⁺ tipo Tr1 expresarán niveles altos de TGF β de la superficie celular.

Se contempla que las células tetrámero+ expandidas de nanosferas de pMHC de clase II, pero no sus homólogas de tetrámero, suprimirán eficazmente la proliferación de células CD8⁺ específicas de Gp33 de LCMV inocuo contra Gp33 y DCs pulsadas con péptido de 2,5 mi (reconocidas por el respondedor y las células tetrámero+ Tr1 CD4⁺, respectivamente). Se cree además que la adición de un mAb anti-IL10 a los cultivos inhibirá parcialmente esta actividad supresora, en comparación con los cultivos que reciben IgG de rata de control. Se cree que los experimentos en ratones diabéticos tratados con nanoesferas IGRP₄₋₂₂/I-A^{g7} y que bloquean anti-IL- 10 o IgG de rata (como control), así como los experimentos en ratones NOD deficientes en perforina mostrarán que la restauración de la normoglucemia por las nanoesferas del pMHC de la clase II es dependiente de IL-10 y de perforina. Se contempla además que el IFN γ es necesario para el desarrollo de las células Tr1 que las nanoesferas pMHC pueden expandir, pero no por su actividad supresora. Las células T autorreactivas cognadas que pueden expandirse en respuesta a la terapia con nanosferas de pMHC en ratones IFN γ -/- pueden tener un fenotipo Th2 (produciendo IL-4 e IL-10 en respuesta al desafío peptídico ex vivo), mientras que las que se expanden en ratones IL-10/- pueden producir IFN γ e IL-4 pero no IL-10. Estos resultados indican que la reversión de la diabetes está mediada por células tipo Tr1.

Ejemplo 4

Expansión de células T utilizando las nanosferas IGRP/Kd-PLGA.

Las nanosferas IGRP206-214/Kd-PLGA inducen la activación de células T CD8⁺ afines in vitro. Este ensayo se realizó esencialmente como se describe en Tsai et al., Immunity (2010) 32, 568 - 680. Brevemente, se cultivaron células T CD8⁺ transgénicas del receptor de células T (TCR) específicas de IGRP206-214/Kd purificadas naturales, de ratones 8.3-NOD, con nanosferas IGRP206-214/Kd-PLGA durante 48h. Los sobrenadantes se ensayaron para IFN-gamma. Las células se pulsaron con 1 µCi de [3H]-timidina y se cosecharon. El CPM y el IFN-gamma se midieron en relación con el número de nanosferas por pocillo. Esto se representa en la Figura 9. La Figura 8 representa una imagen ampliada de las partículas de PLGA conjugadas con IGRP/Kd. Las partículas de PLGA se prepararon de acuerdo con lo siguiente: Concentración: 100 nm (PLGA: 20 mg/ml en 1,5 mL).

Tamaño DLS: 154,72 nm

Conjugación pMHC: conjugado 5 mg IGRP/Kd con 2 ml de partículas PLGA

Volumen final: 2 ml

Referencias

- Pat. de EE.UU. Nº 4.367.110
- Pat. de EE.UU. Nº 4.452.901
- Pat. de EE.UU. Nº 4.554.101
- 5 Pat. de EE.UU. No. 4.589.330
- Pat. de EE.UU. No. 4.818.542
- Pat. de EE.UU. Nº 6.103.379
- Pat. de EE.UU. Nº 6.387.498
- Pat. de EE.UU. Nº 6.651.655
- 10 Pat. de EE.UU. 6.712.997
- Publicación de EE.UU. 20050202032
- Publicación de EE.UU. 20090155292
- Aichele et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 444 - 448, 1994.
- Amrani et al, J. Immunology, 167: 655 - 666, 2001.
- 15 Amrani et al, Nature, 406: 739 - 744, 2000.
- Anderson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 931 1 - 9316, 1999.
- Anderton and Wraith, Eur. J. Immunol, 28: 1251 - 1261, 1998.
- Arden et al., Diabetes, 48: 531 - 539, 1999.
- Atkinson and Maclaren, N. Engl. J. Med., 331: 1428 - 1436, 1994.
- 20 Atkinson and Maclaren, Sci. Am., 7: 62 - 67, 1990.
- Banga, En: Therapeutic Peptides and Proteins. Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Pub. Co., Inc., Lancaster, Pa., 1995.
- Barany and Merrifield, En: The Peptides, Gross and Meienhofer (Eds.), Academic Press, NY, 1-284, 1979.
- Bielekova et al., Nat. Med., 6:1167-1175, 2000.
- 25 Bottazzo et al., N. Engl. J. Med., 313:353-360, 1985.
- Brinker and Scherer, En: Sol-gel Science, Academic Press, 1990.
- Burke et al., J. Inf. Dis., 170:1110-1119, 1994.
- Cao et al., Hum. Immunol., 62:1009, 2001.
- Caruso et al., Macromolecules, 32(7):2317-2328, 1999.
- 30 Caruso, J. Amer. Chem. Soc., 121(25):6039-6046, 1999.
- Castano and Eisenbarth, Annu Rev. Immunol., 8:647-679, 1990.
- Chentoufi and Polychronakos, Diabetes, 51:1383, 2002.
- Chou and Fasman, Adv. Enzymol., 47:45-148, 1978a.
- Chou and Fasman, Annu Rev. Biochem., 47:251-276, 1978b.
- 35 Chou and Fasman, Biochemistry, 13(2):211-222, 1974a.
- Chou and Fasman, Biochemistry, 13(2):222-245, 1974b.
- Chou and Fasman, Biophys. J, 26(3):385-399, 1979.

- Davies, *Advanced Materials*, 10:1264-1270, 1998.
- DiLorenzo, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:12538-12543, 1998.
- Doytchinova et al., *J. Immunol.*, 172:4314, 2004.
- Epitope Mapping Protocols (1996)
- 5 Fennessy et al., *Diabetologia*, 37:937-945, 1994.
- Golman and Shinohara, *Trends Chem. Engin.*, 6:1-6, 2000.
- Goulder et al. *J. Exp. Med.*, 192:1819-1832, 2000.
- Group, D. P. T.-T. D. S, *N. Engl. J. Med.*, 346:1685-1691, 2002.
- Haller et al., *N. Engl. J. Med.*, 353:2086-2087, 2005.
- 10 Hamilton-Williams et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:11533, 2001.
- Han et al., *J. Clin. Invest.*, 115:1879 2005.
- Han et al., *Nat. Med.*, 11:645-652, 2005.
- Hanninen et al., *J. Clin. Invest.*, 90:1901-1910, 1992.
- Hanprasopwattana, *Langmuir*, 12:3173-3179, 1996
- 15 Honeyman et al., *Mol. Med.*, 1(5):576-582, 1995.
- Iler En: *Chemistry of Silica*, John Wiley & Sons, 1979.
- Imagawa et al., *Diabetes*, 50:1269-1273, 2001.
- Itoh et al., *J. Clin. Invest.*, 92:2313-2322, 1993.
- Kappos et al., *Nat. Med.*, 6:1176-1182, 2000.
- 20 Karin et al., *J. Exp. Med.*, 180:2227-2237, 1994.
- Kent et al., *Nature*, 435:224-228, 2005.
- Keymeulen et al. *N. Engl. J. Med.*, 352(25):2598-608, 2005.
- Kreuter, En: *Colloidal Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., NY., 219-342, 1994.
- Liblau et al., *Immunity*, 17:1-6, 2002.
- 25 Lieberman and DiLorenzo, *Tissue Antigens*, 62:359-377, 2003.
- Lieberman et al., *J. Immunol.*, 173:6727, 2004.
- Lieberman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:8384-8388, 2003.
- Liu and Wraith, *Int. Immunol.*, 7:1255-1263, 1995.
- Maree et al., *Int. Immunol.*, 18:1067-1077, 2006.
- 30 Martin et al., *J. Biol. Chem.*, 276:25197-25207, 2001.
- McKown, et al., *Arthritis Rheum.*, 42:1204-1208, 1999.
- Merrifield, *Science*, 232(4748):341-347, 1986.
- Metzler and Wraith, *Int. Immunol.*, 5:1159-1165, 1993.
- Miller et al., *J. Exp. Med.*, 149:758-766, 1979.
- 35 Moore et al., *Diabetes*, 53:1459-1466, 2004.
- Moriwaki et al., *Diabetologia*, 42:1332-1340, 1999.
- Nakanishi et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:3721-3725, 1999.

- Nakayama et al., *Nature*, 435:220-224, 2005.
- Nejentsev et al., *Diabetes*, 46:1888-1895, 1997.
- Owerbach, *Diabetes*, 49:508-512, 2000.
- Palmer et al., *Science*, 222:1337-1339, 1983.
- 5 Partch and Brown., *J Adhesion*, 67:259-276, 1998.
- Pascolo et al., *J. Exp. Med.*, 185:2043, 1997.
- Pekarek et al., *Nature*, 367:258, 1994.
- Pinkse et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:18425-18430, 2005.
- Pociot and McDermott, *Genes Immun.*, 3:235-249, 2002.
- 10 Pozzilli, et al., *Diabetologia*, 43:1000-1004, 2000.
- Robles et al., *Clin. Immunol.*, 102:117-224, 2002.
- Santamaria et al., *Diabetes*, 41:53-61, 1992.
- Santamaria et al., *J. Immunol.*, 154:2494, 1995.
- Santamaria, *Curr. Opin Immunol.*, 13:663-669, 2001.
- 15 Serreze et al., *Diabetes*, 43:505, 1994.
- Serreze et al., *Diabetes*, 50:1992-2000, 2001.
- Sibley et al., *Lab. Invest.*, 53:132-144, 1985.
- Sidney et al., *Hum. Immunol.*, 45:79, 1996.
- Somoza et al., *J. Immunol.*, 153:1360-1377, 1994.
- 20 Stewart and Young, *En: Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co., 1984.
- Sukhorukov et al., *Polymers Adv. Tech.*, 9 (10-11):759-767, 1998.
- Tait et al., *Hum. Immunol.*, 42:116-124, 1995.
- Takaki et al., *J. Immunol.*, 176:3257-3265, 2006.
- Tam et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983.
- 25 Tan et al., *J. Exp. Med.*, 12:1523-1532, 2002.
- Tice & Tabibi, *En: Treatise on Controlled Drug Delivery*, Kydonieus (Ed.), Marcel Dekker, Inc. NY, 315-339, 1992.
- Tigges et al., *J. Immunol.*, 156(10):3901-3910, 1996.
- Toes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7855-7860, 1996.
- Toma et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:10581-10585, 2005.
- 30 Trentham, et al., *Science*, 261:1727-1730, 1993.
- Trudeau et al., *J. Clin. Invest.*, 111:217-223, 2003.
- Verdaguer et al., *J Immunology*, 157:4726-4735, 1996.
- Verdaguer et al., *J. Exp. Med.*, 186:1663-1676, 1997.
- Weiner, *Science*, 259:1321-1324, 1993.
- 35 Wong et al., *Nat. Med.*, 5:1026-1031, 1999.
- Wraith et al., *Cell*, 59:247-255, 1989.
- Yeaman et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, 955:174-182, 2002.

Listado de secuencias

- <110> UTI Limited Partnership
- <120> Métodos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes utilizando nanoesferas bioabsorbentes y biocompatibles
- 5 <130> UTI-C-P1347PCT (378701-0360)
- <140> Desconocido
- <141> 2011-09-29
- <150> 61/387873
- <151> 2010-09-29
- 10 <160> 66
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 9
- <212> PRT
- 15 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
- <400> 1
- His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
- 1 5
- 20 <210> 2
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
- <400> 2
- Leu Asn Ile Asp Leu Leu Trp Ser Val
- 1 5
- <210> 3
- <211> 9
- 30 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
- <400> 3
- Val Leu Phe Gly Leu Gly Phe Ala Ile
- 35 1 5
- <210> 4
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
- <400> 4
- Val Tyr Leu Lys Thr Asn Val Phe Leu
- 1 5
- 45 <210> 5
- <211> 9
- <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 5
Val Tyr Leu Lys Thr Asn Leu Phe Leu
5 1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 6
Lys Tyr Asn Lys Ala Asn Ala Phe Leu
1 5

15 <210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

20 <400> 7
Lys Tyr Asn Ile Ala Asn Val Phe Leu
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 8
Lys Tyr Asn Lys Ala Asn Val Phe Leu
1 5

30 <210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 9
Phe Gln Asp Glu Asn Tyr Leu Tyr Leu
1 5

<210> 10
<211> 9
40 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 10
Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly
45 1 5

<210> 11

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

 <400> 11
 Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Ile
 1 5

 <210> 12
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

 <400> 12
 Lys Tyr Gln Ala Val Thr Thr Thr Leu
 1 5
 15

 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

 <400> 13
 Lys Tyr Cys Leu Ile Thr Ile Phe Leu
 1 5

 <210> 14
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

 30 <400> 14
 Val Met Asn Ile Leu Leu Gln Tyr Val Val
 1 5 10

 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

 <400> 15
 Arg Met Met Glu Tyr Gly Thr Thr Met Val
 1 5 10
 40

 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

 <400> 16
 Asn Leu Ala Gln Thr Asp Leu Ala Thr Val
 1 5 10

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 17
 Gln Leu Ala Arg Gln Gln Val His Val
 1 5
 10 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 15 <400> 18
 Ser Leu Ser Pro Leu Gln Ala Glu Leu
 1 5
 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 19
 Ser Leu Ala Ala Gly Val Lys Leu Leu
 1 5
 25 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 20
 Val Ile Val Met Leu Thr Pro Leu Val
 1 5
 <210> 21
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 21
 Lys Leu Gln Val Phe Leu Ile Val Leu
 40 1 5
 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 22

Phe Leu Ile Val Leu Ser Val Ala Leu
 1 5
 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 23
 Phe Leu Trp Ser Val Phe Met Leu Ile
 1 5
 10 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 24
 Asn Leu Phe Leu Phe Leu Phe Ala Val
 1 5
 <210> 25
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 25
 Phe Leu Phe Ala Val Gly Phe Tyr Leu
 25 1 5
 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 26
 Tyr Leu Leu Leu Arg Val Leu Asn Ile
 1 5
 <210> 27
 35 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 27
 Arg Leu Leu Cys Ala Leu Thr Ser Leu
 40 1 5
 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 28
 Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu
 1 5

<210> 29
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 29
 Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu
 10 1 5

<210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 30
 Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5

20 <210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

25 <400> 31
 His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala
 1 5 10

<210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 32
 Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg
 1 5

35 <210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 40 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 33
 Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
 1 5 10

<210> 34
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 34
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe
1 5

5 <210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

10 <400> 35
Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr
1 5 10

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 36
Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr
1 5

20 <210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 37
Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys
1 5

<210> 38
<211> 9
30 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 38
Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu
35 1 5

<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 39
Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu
1 5 10

45 <210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 40
 Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly
 1 5

5 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 41
 Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
 1 5

15 <210> 42
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 42
 Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln
 1 5 10

20 <210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 43
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile
 1 5 10

30 <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 44
 Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile
 1 5

35 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 45
 Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
 1 5

45 <210> 46
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 46
Ser Leu Leu Leu Glu Leu Glu Glu Val
5 1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 47
Leu Met Trp Ala Lys Ile Gly Pro Val
1 5

15 <210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

20 <400> 48
Val Leu Phe Ser Ser Asp Phe Arg Ile
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 49
Ser Leu Ser Arg Phe Ser Trp Gly Ala
1 5

30 <210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 50
Lys Val Glu Asp Pro Phe Tyr Trp Val
1 5

<210> 51
<211> 10
40 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 51
Arg Thr Phe Asp Pro His Phe Leu Arg Val
45 1 5 10

<210> 52

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

 <400> 52
 Phe Leu Arg Val Pro Cys Trp Lys Ile
 1 5

 <210> 53
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

 <400> 53
 Lys Ile Thr Leu Phe Val Ile Val Pro Val
 1 5 10
 15

 <210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

 <400> 54
 Val Leu Gly Pro Leu Val Ala Leu Ile
 1 5

 <210> 55
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

 30 <400> 55
 Thr Leu Phe Val Ile Val Pro Val Leu
 1 5

 <210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

 <400> 56
 Arg Leu Ala Gly Gln Phe Leu Glu Glu Leu
 1 5 10

 40 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

 <400> 57
 Phe Leu Tyr Gly Ala Leu Leu Leu Ala
 1 5

<210> 58
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 58
 Val Tyr Leu Ala Thr Asn Val Ala Leu
 1 5
 10 <210> 59
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 15 <400> 59
 Ala His His Pro Ile Trp Ala Arg Met Asp Ala
 1 5
 <210> 60
 <211> 18
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 60
 Thr Ala Ala Leu Ser Tyr Thr Ile Ser Arg Met Glu Glu Ser Ser Val Thr Leu
 1 5 10 15
 25 <210> 61
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 61
 Leu His Arg Ser Gly Val Leu Ile Ile His His Leu Gln Glu Asp Tyr Arg Thr Tyr
 1 5 10 15
 <210> 62
 <211> 20
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 62
 His Thr Pro Gly Val His Met Ala Ser Leu Ser Val Tyr Leu Lys Thr Asn Val Phe
 Leu
 1 5 10 15
 40 20
 <210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 63
 Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Ala Gly Glu Arg Gly
 1 5 10 15
 <210> 64
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 64
 Leu Ser Ile Ala Leu His Val Gly Phe Asp His
 10 1 5 10
 <210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 65
 Arg His Gly Leu Asp Asn Tyr Arg Gly
 1 5
 <210> 66
 20 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
 25 <400> 65
 Ala Met Lys Arg His Gly Leu Asp Asn Tyr Arg Gly Tyr Ser Leu
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

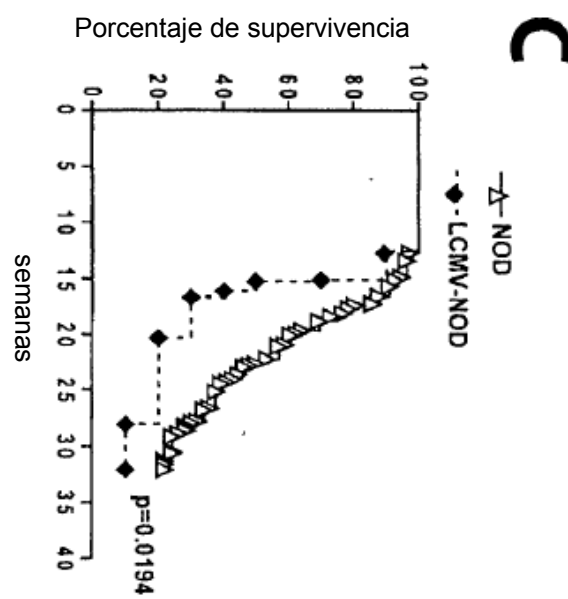
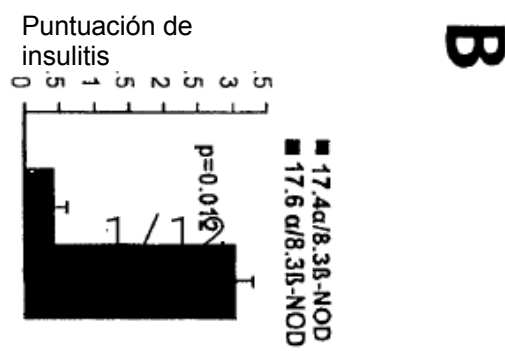
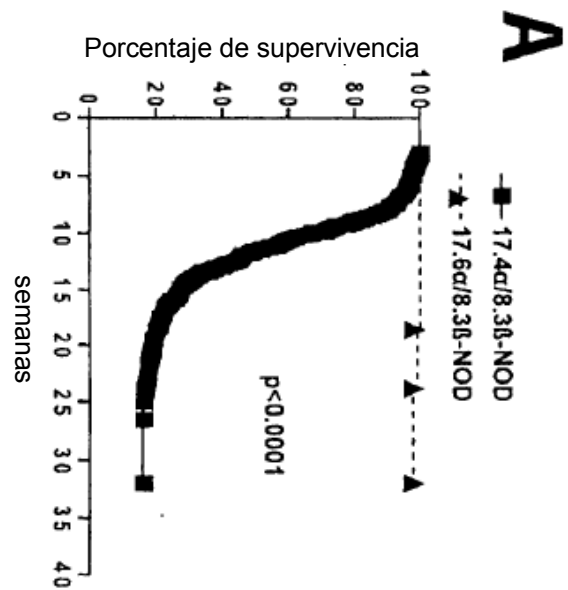
- 5 1. Una composición de nanopartículas de alta densidad de partículas que comprende complejos de antígeno-MHC acoplados a una relación de más de 50 a 200 a una nanoesfera bioabsorbible y biocompatible que tiene un diámetro de 4 nm o de 5 a 15 nm para su uso en un método para prevenir o tratar un trastorno autoinmune cuando se administra a un sujeto para expandir las células T autorreactivas anti-patógenas.
2. Una composición de nanopartículas de alta densidad de partículas que comprende complejos de antígeno-MHC acoplados a una proporción de más de 50 a 200 a una nanoesfera bioabsorbible y biocompatible que tiene un diámetro de 4 nm o de 5 a 15 nm para su uso en un método para expandir y/o desarrollar poblaciones de células T autorreactivas y anti-patógenas en un sujeto cuando se administra para expandir dichas poblaciones.
- 10 3. La composición para uso de la reivindicación 1 ó 2, en la que una pluralidad de epítopes auto-antígenos están contenidos en dichos complejos antígeno-MHC.
4. La composición para uso de la reivindicación 3, en la que dicha pluralidad de epítopes auto-antígenos se derivan de un único auto-antígeno o una pluralidad de auto-antígenos.
- 15 5. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en la que la población expandida de células T autorreactivas anti-patógenas es específica de antígeno pero suprime de una manera no específica de antígeno.
6. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en la que la administración de dichas nanosferas bioabsorbibles y biocompatibles reduce la población de células T autorreactivas patógenas afines o no afines.
- 20 7. Un complejo de nanoesferas bioabsorbibles y biocompatibles de epítipo-MHC auto-antígeno que comprende un núcleo biocompatible y un revestimiento biodegradable y bioabsorbible sobre la superficie externa de dicho núcleo y complejos de antígeno-MHC de alta densidad acoplados en una relación de más de 50 a 200 a una nanoesfera bioabsorbible y biocompatible que tiene un diámetro de 4 nm o de 5 a 15 nm, en donde los complejos de antígeno-MHC de alta densidad se acoplan al núcleo biocompatible o al revestimiento biodegradable y bioabsorbible.
- 25 8. El complejo de nanoesferas bioabsorbible y biocompatible de epítipo-MHC auto-antígeno de la reivindicación 7, en el que dicho núcleo biocompatible comprende un metal, hierro, óxido de hierro, un polímero u oro.
9. El complejo de nanoesfera bioabsorbible biocompatible de epítipo-MHC de auto-antígeno de la reivindicación 7 u 8, en el que dicho revestimiento biodegradable y bioabsorbible se selecciona entre dextrano, manitol y poli(etilenglicol).
- 30 10. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o el complejo de cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que dicho acoplamiento comprende además un enlazador y en el que el enlazador es opcionalmente etilenglicol.
11. La composición para uso de la reivindicación 1, en la que la molécula de MHC comprende moléculas de MHC de clase II.
- 35 12. La composición para uso de la reivindicación 1, en la que dichas células T autorreactivas son células CD4⁺ TR1 y opcionalmente en las que las células CD4⁺ TR1 se caracterizan por la expresión de IL-10 e IFN γ .
13. La composición para uso de la reivindicación 1, en la que los complejos de antígeno-MHC están acoplados covalentemente a la nanosfera bioabsorbible y biocompatible, en donde la molécula de MHC comprende moléculas de MHC de Clase II y en donde las células T autorreactivas anti-patógenas son células TR1 que expresan IL-10.
- 40 14. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y 11-13, o el complejo de cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que el MHC es MHC I o MHC II o una combinación de los mismos y opcionalmente en el que dicho acoplamiento comprende además un enlazador.
- 45 15. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 ó 11-13, o el complejo de cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que dicho trastorno o enfermedad autoinmune es la prediabetes, diabetes, diabetes tipo I, diabetes tipo II, asma alérgica, esclerosis múltiple, cirrosis biliar primaria, neuromielitis óptica, penfigo vulgaris, enfermedad del intestino irritable, enfermedad de Crohn, colitis, artritis reumatoide, artritis psoriásica, lupus eritematoso sistémico, enfermedad celíaca, psoriasis, cardiomiopatía, miastenia gravis, uveítis, espondilitis anquilosante, enfermedad de Grave, miopatía inflamatoria o síndrome del anticuerpo anti-fosfolípido y opcionalmente en el que dicho acoplamiento comprende además un enlazador.
- 50 16. El complejo de cualquiera de las reivindicaciones 7-9, o la composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en el que una pluralidad de epítopes de auto-antígeno están contenidos en dichos complejos de antígeno-MHC que se derivan de un solo auto-antígeno o una pluralidad de auto-antígenos y opcionalmente en el que dicho acoplamiento comprende además un enlazador.

17. La composición para uso de las reivindicaciones 1, 2 ó 11, en la que:

a) la enfermedad autoinmune es la diabetes tipo I, el antígeno se deriva de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en PPI, IGRP, GAD, o pro-insulina, y el componente MHC comprende todo o parte de HLA-DR; o

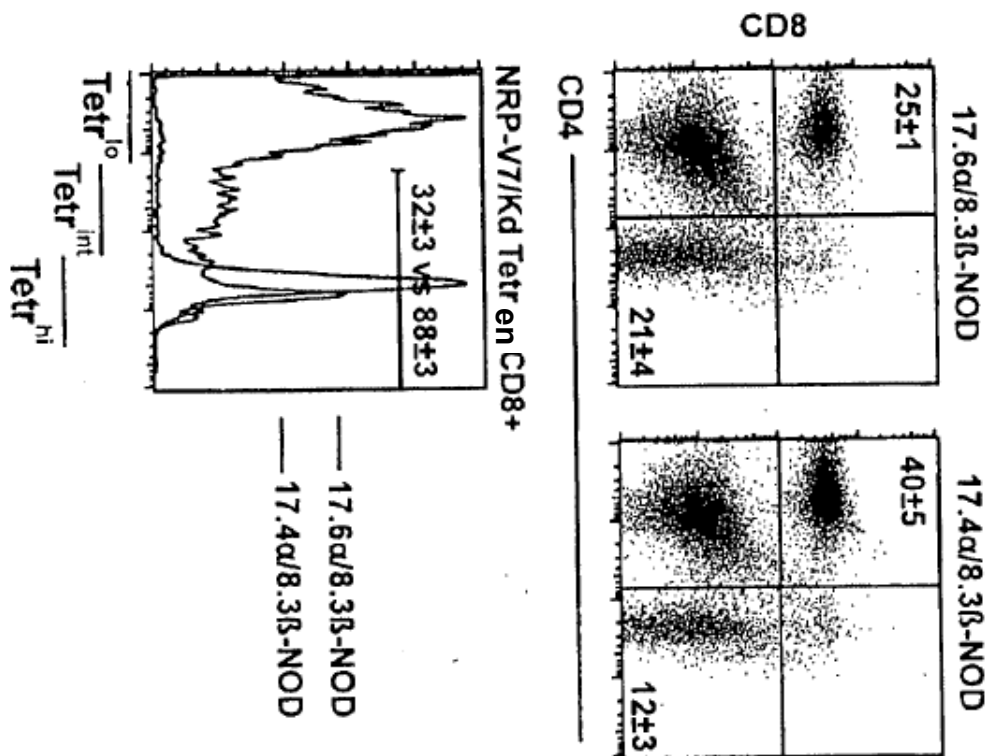
5 b) la enfermedad autoinmune es la esclerosis múltiple, el antígeno se deriva de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en MOG, MBP o PLP, y el componente MHC comprende todo o parte de HLA-DR.

18. Una formulación de dosificación que comprende la composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 11 ó 17, en la que la cantidad de complejos de antígeno-MHC por dosis es de 0,024 a 121,6 mg.

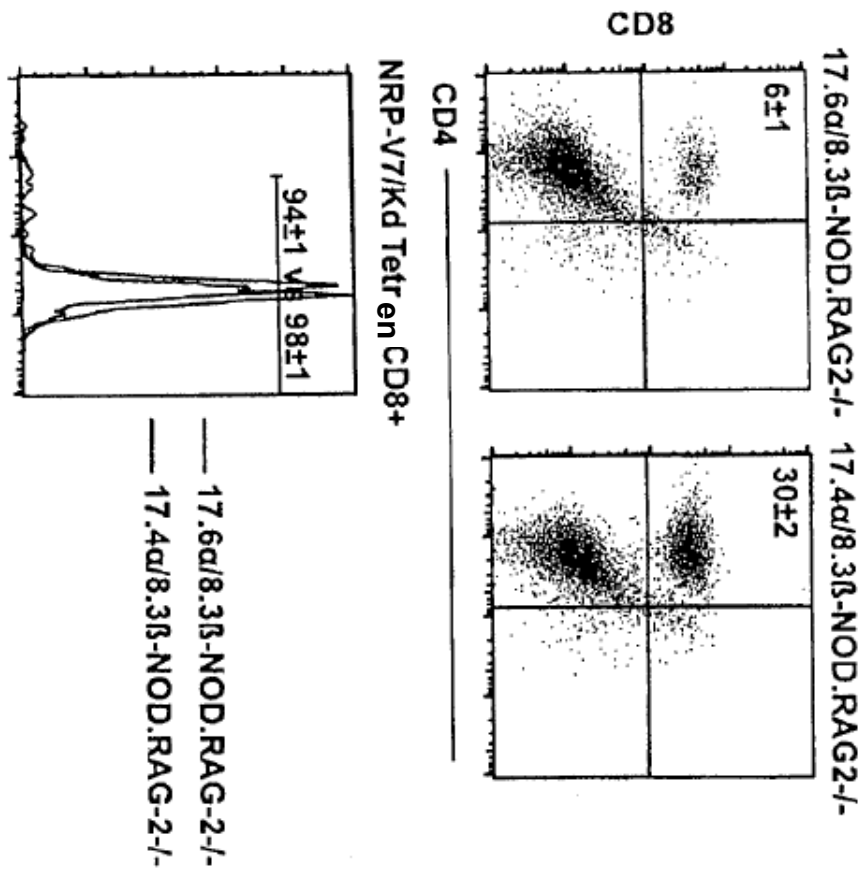


FIGS 1A - 1C

A



B



FIGS 2A – 2B

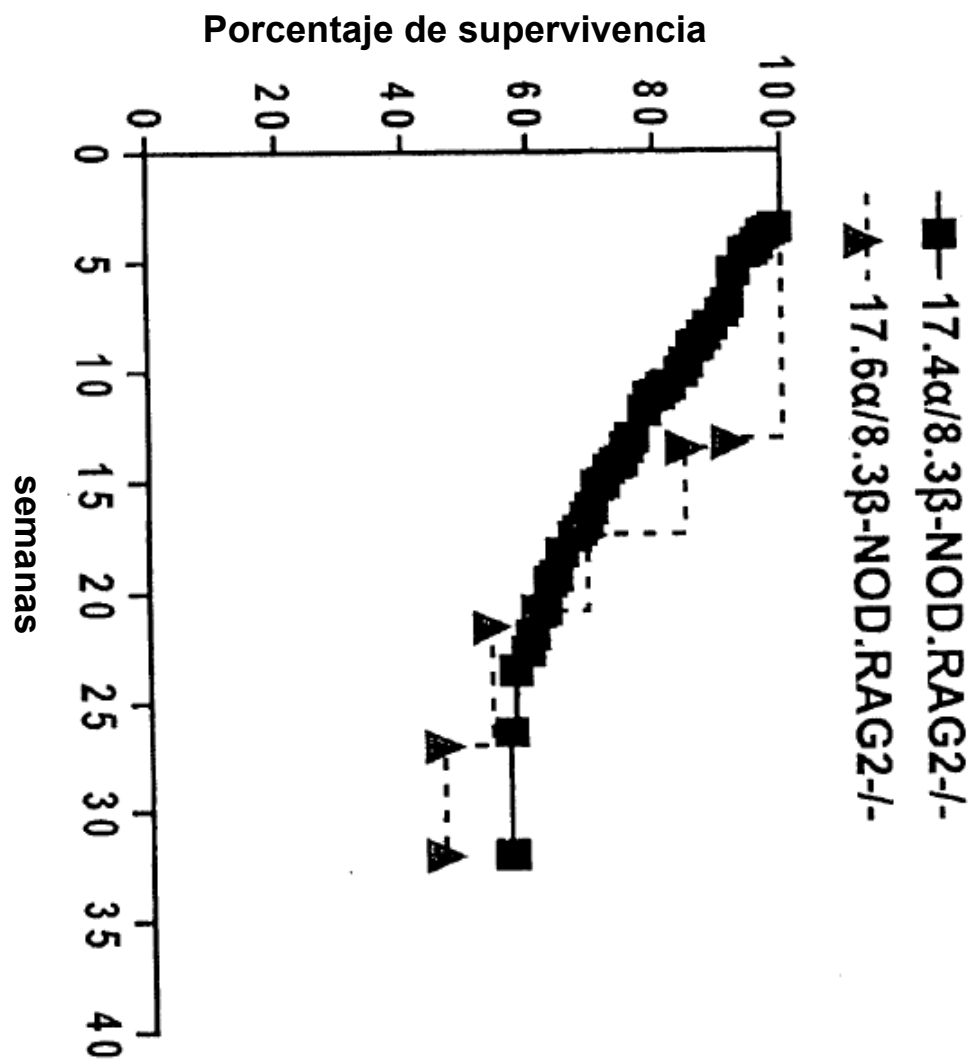
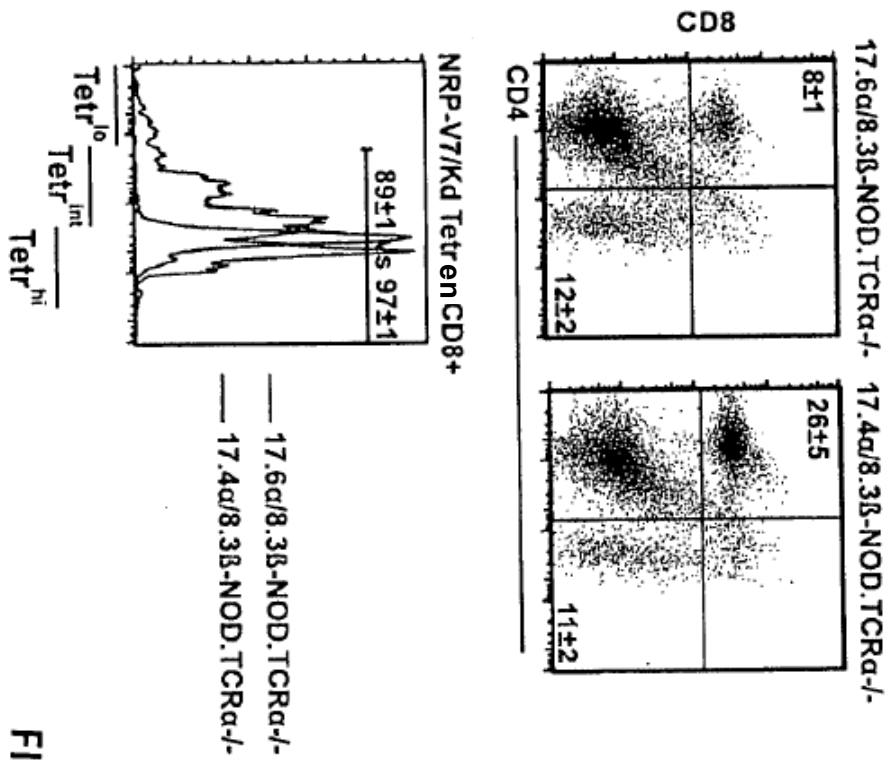
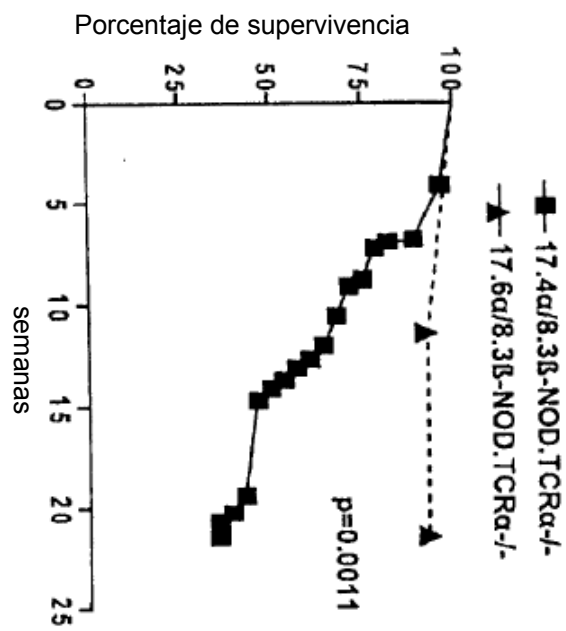


FIG 3

A



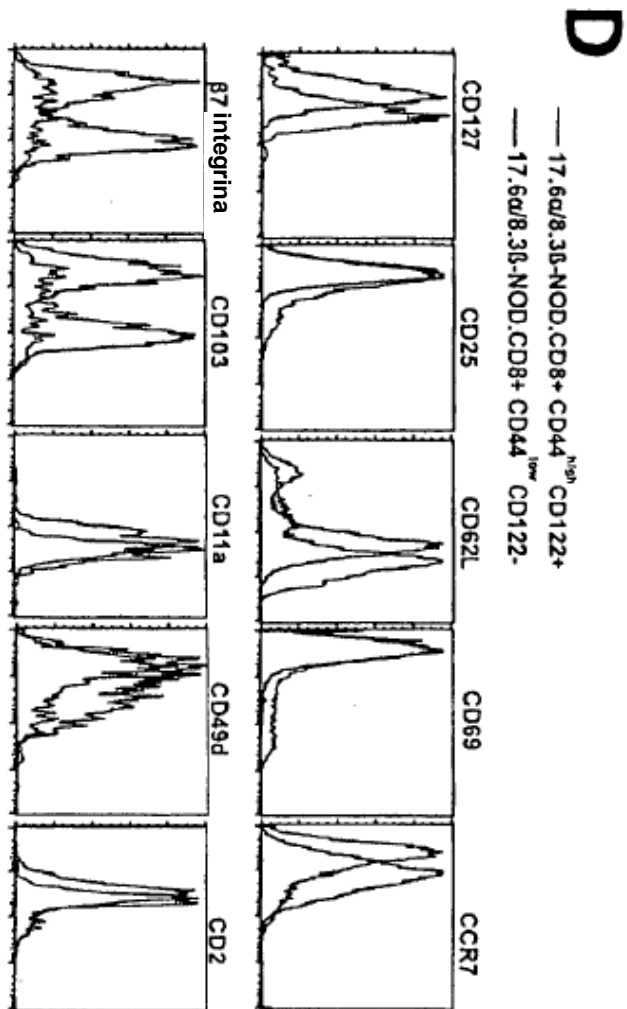
B



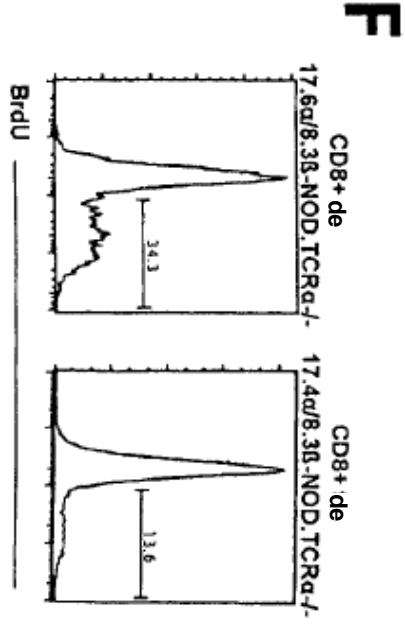
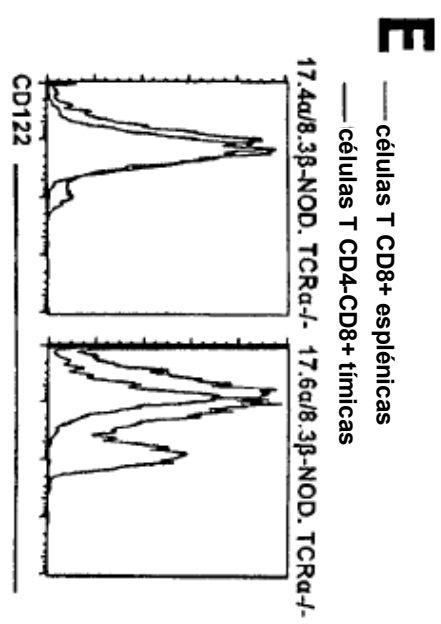
FIGS 4A – 4B

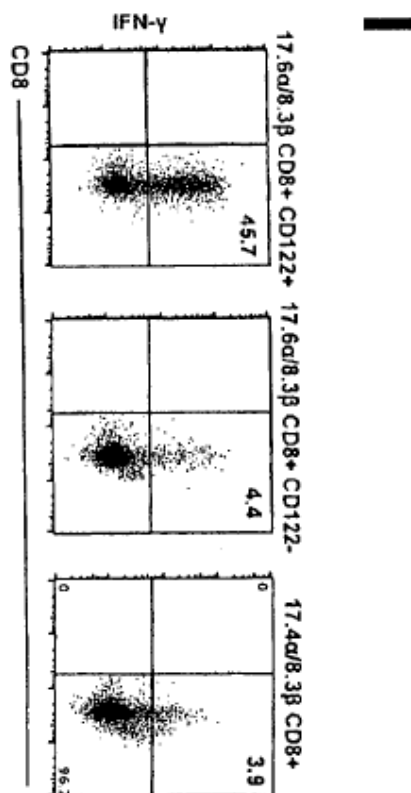
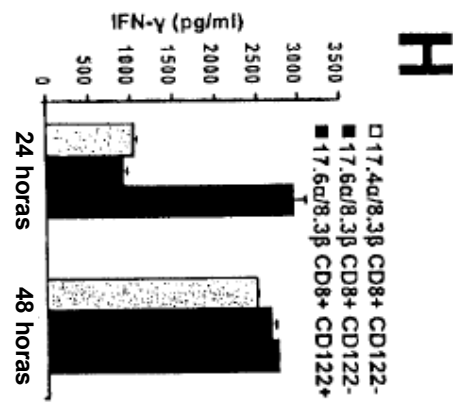
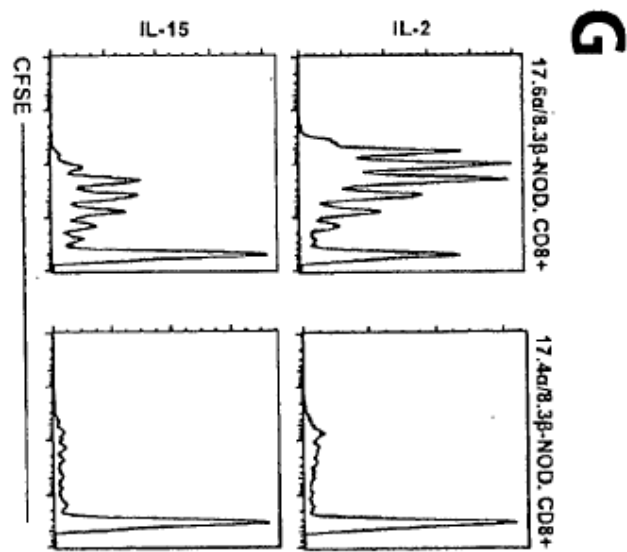


FIGS 5A – 5C



FIGS 5D – 5F





FIGS 5G – 5I

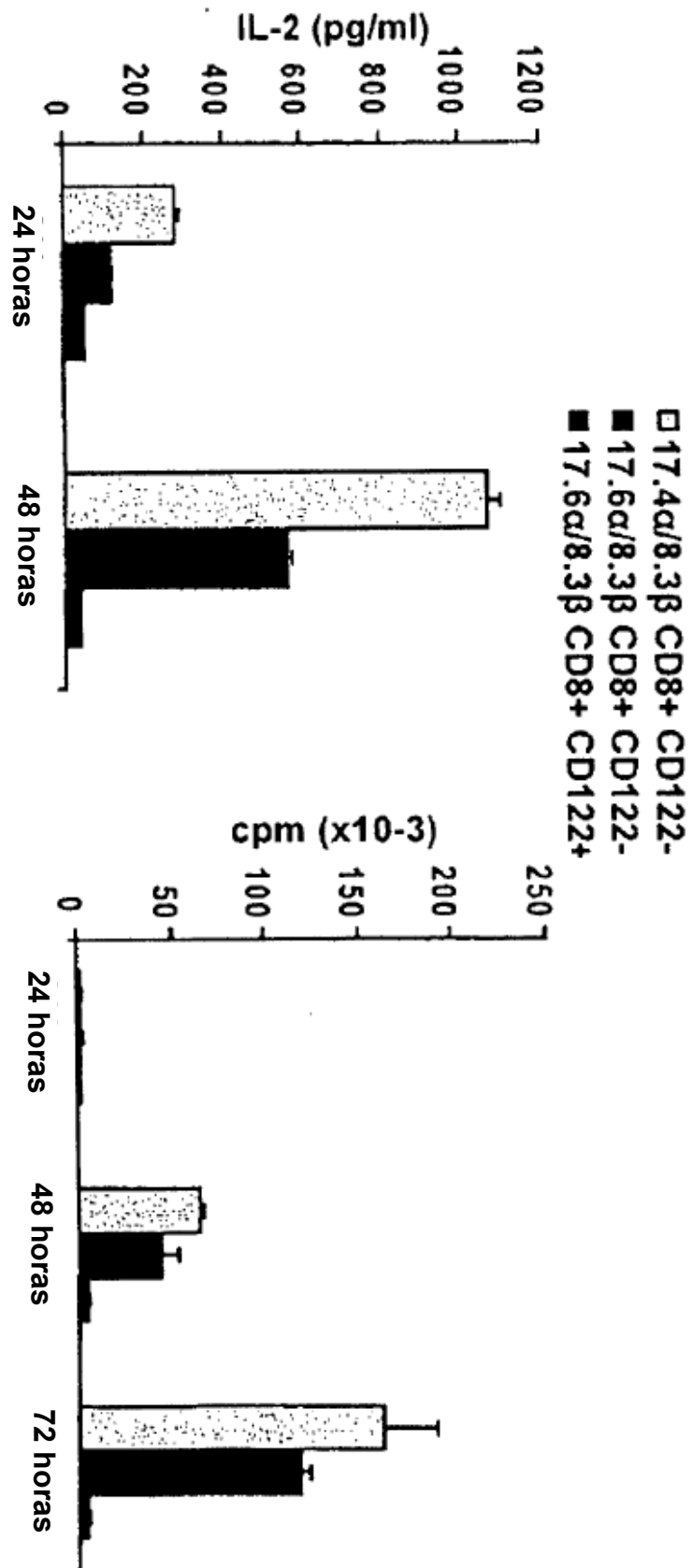


FIG 5J

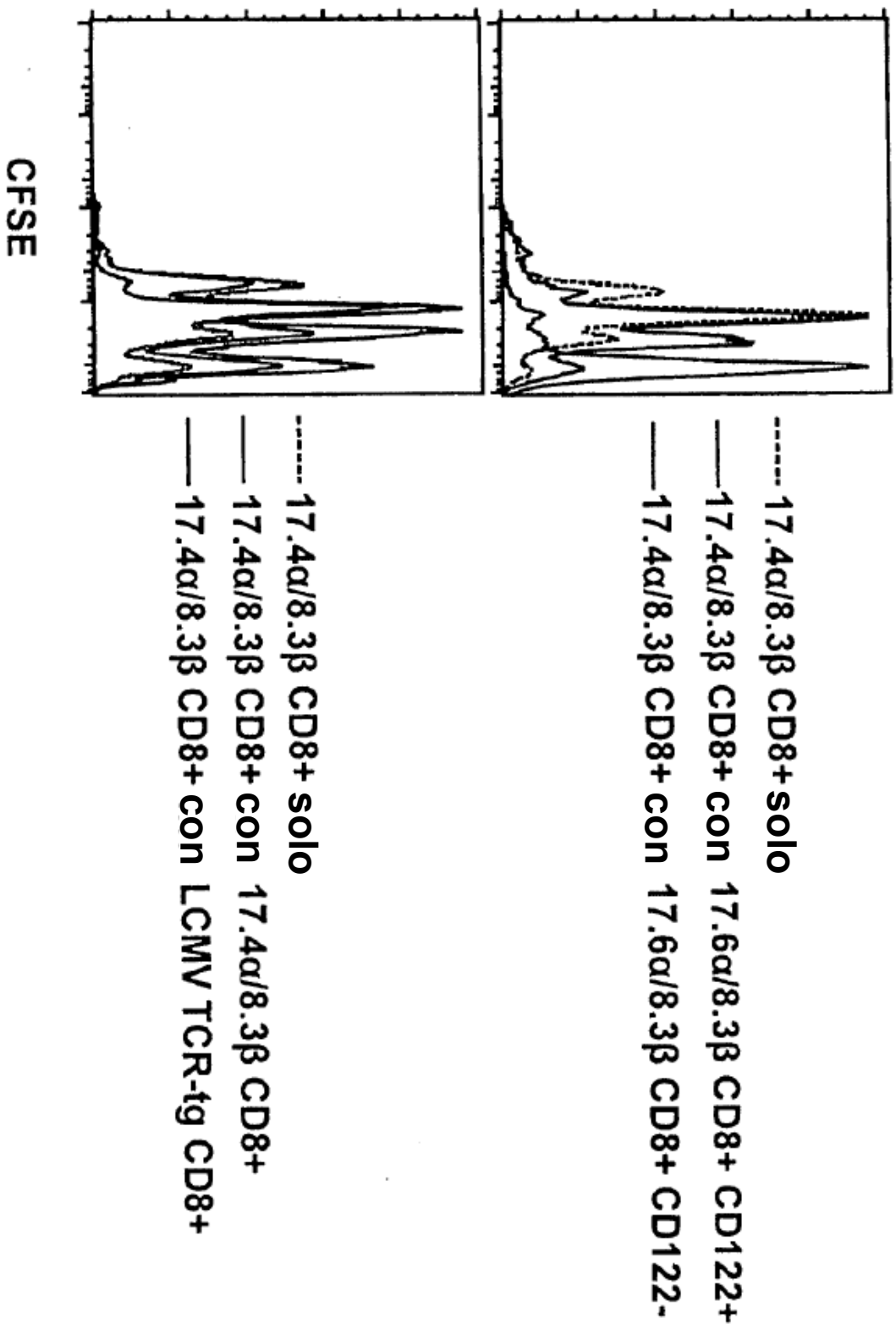
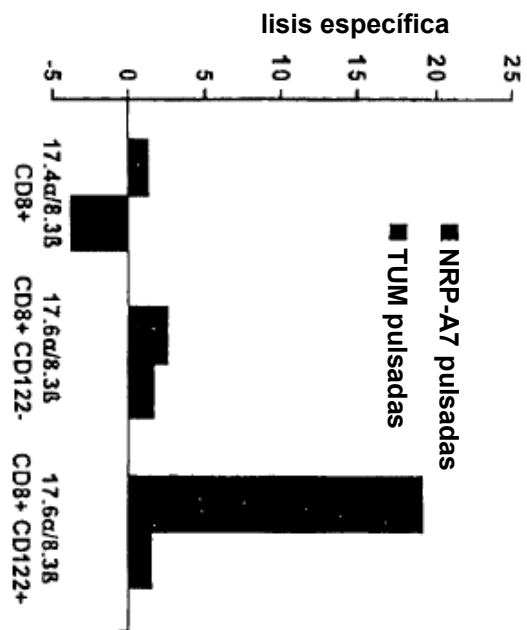
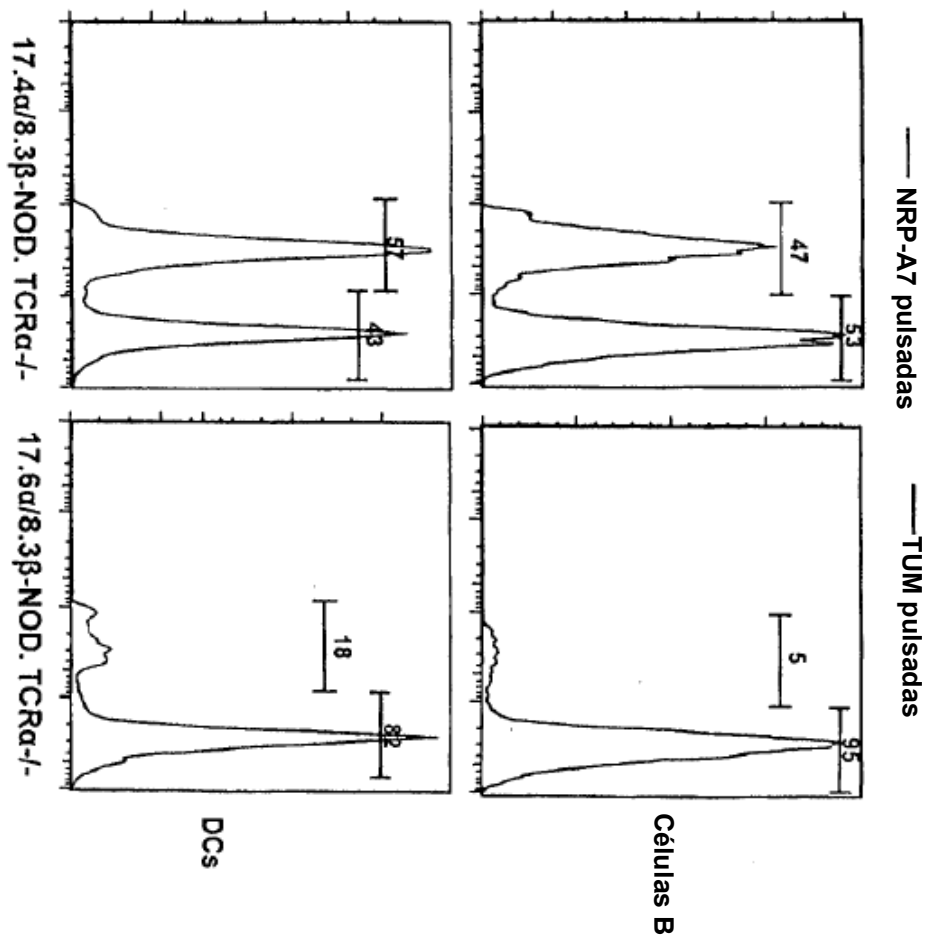


FIG 6

A



B



FIGS 7A – 7B

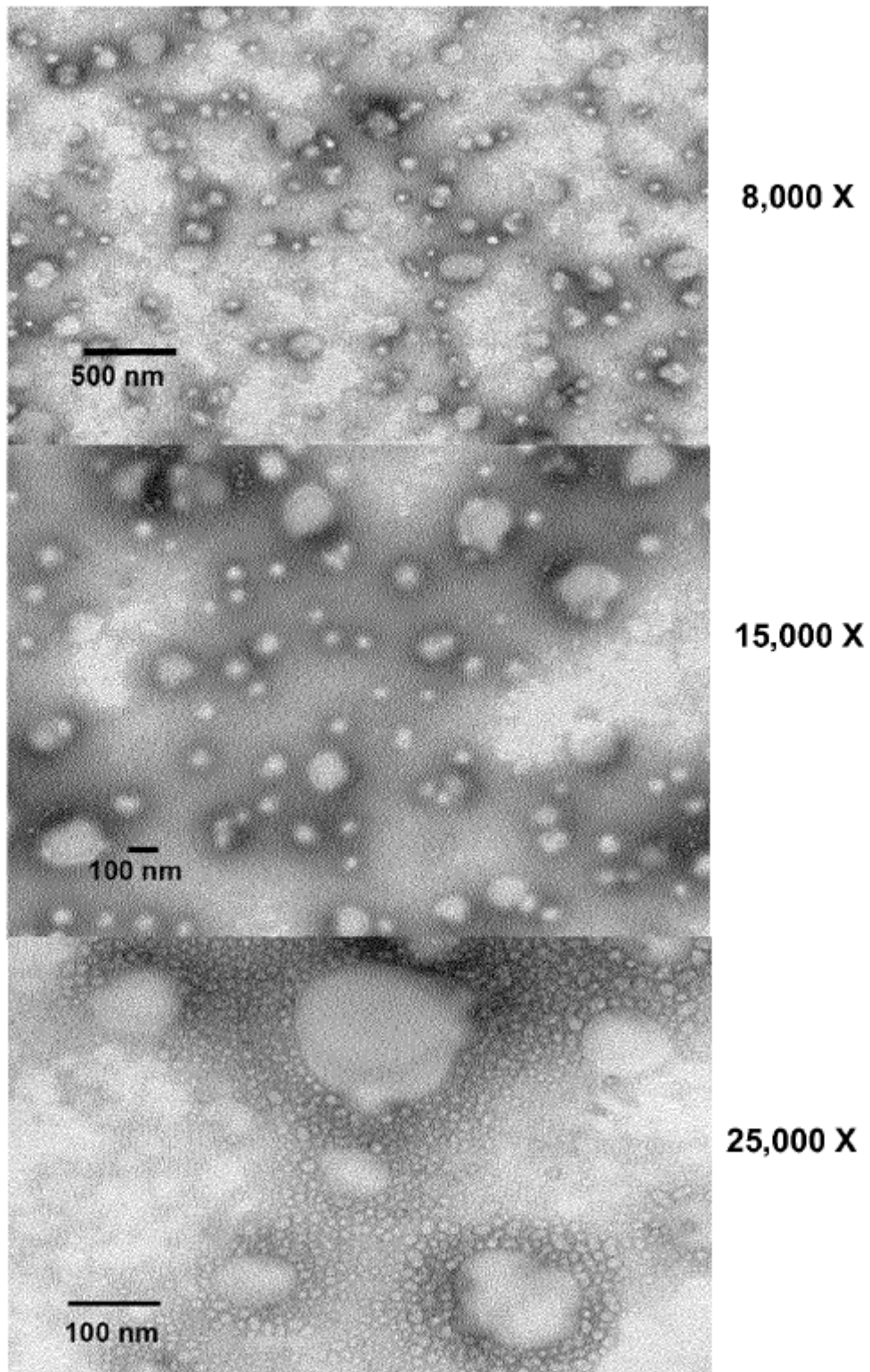


Fig. 8

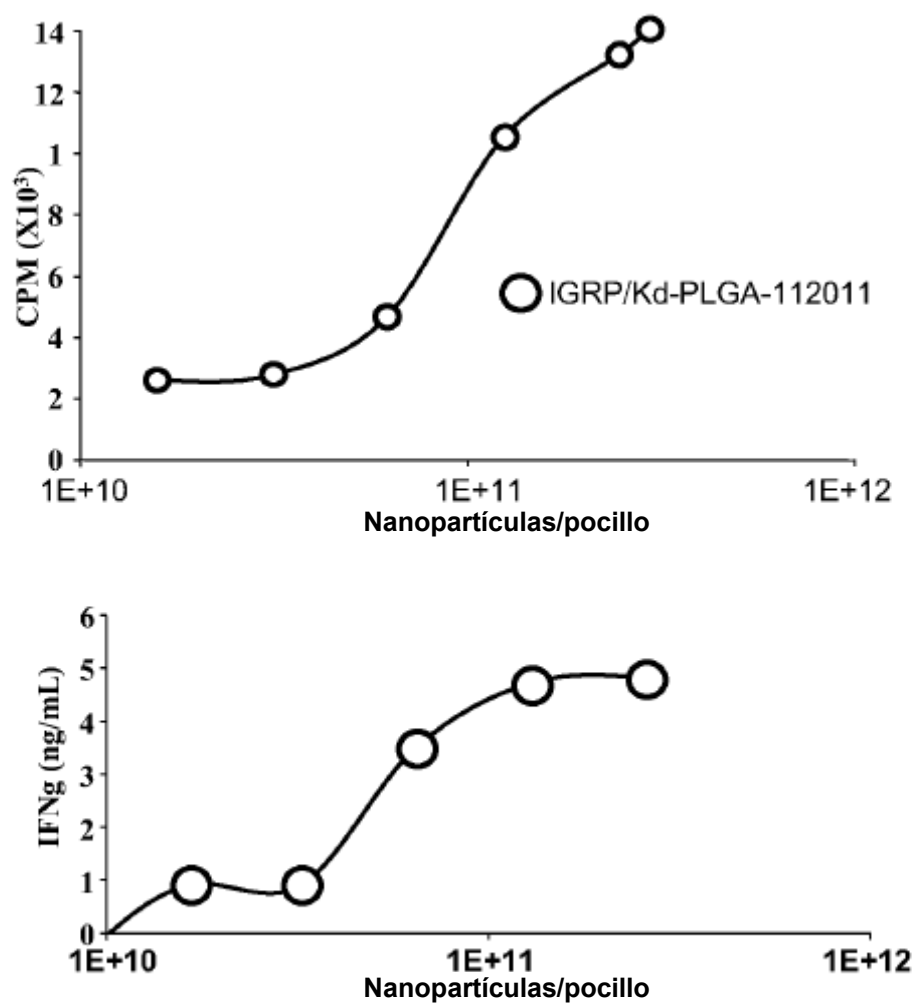


Fig. 9