

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 391**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 47/50 (2007.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2007 PCT/US2007/004671**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2007 WO07098254**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2007 E 07751436 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 1993511**

54 Título: **Nanopartículas para inmunoterapia**

30 Prioridad:

21.02.2006 US 775132 P
19.02.2007 US 707627

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2019

73 Titular/es:

**ECOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE
LAUSANNE (EPFL) (100.0%)
EPFL-TTO, EPFL Innovation Park J
1015 Lausanne, CH**

72 Inventor/es:

**REDDY, SAI T.;
HUBBELL, JEFFREY A.;
SWARTZ, MELODY A. y
VAN DER VLIES, ANDRE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 709 391 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

Nanopartículas para inmunoterapia

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad a la patente de Estados Unidos con el número de serie 60/775.132, presentada el 21 de febrero de 2006.

10 Campo técnico

El campo técnico se refiere, en algunos aspectos, a nanopartículas con químicas de superficie para la activación del sistema inmunológico.

15 Antecedentes

Se podrían obtener muchos beneficios médicos si se pudiera entrenar el sistema inmunitario para que respondiera a antígenos de una forma deseada, tal como desarrollando tolerancia al antígeno o aprendiendo a rechazarlo. Se han tratado de aplicar diversos enfoques para afrontar este desafío, incluidos tratamientos farmacológicos sistémicos, la inyección de antígenos y tratamientos con anticuerpos.

20 Rehere A., "Poly(propylene sulfide)nanoparticles as drug carriers" Swiss Federal Institute of Technology Zurich, vol. Dissertation ETH 15861 2005, páginas 133-148, XP002730080, recuperada desde Internet: URL: <http://e-collection.library.ethz.ch/eserv/eth:27681/eth-27681-02.pdf> [recuperada el 22/02/2014] expone en una disertación sobre las propiedades de nanopartículas de PPS.

30 Reddy ST, et al. informan en J Control Release, 1 de mayo de 2006; 112 (1): 26-34. Epub 10 de marzo de 2006, sobre el direccionamiento *in vivo* de nanopartículas de poli(sulfuro de propileno) a células dendríticas de los ganglios linfáticos. El suministro de nanopartículas biodegradables a células presentadoras de antígenos (CPA), específicamente células dendríticas (CD), tiene potencial para inmunoterapia. El estudio investiga la administración de nanopartículas de poli(sulfuro de propileno) (PPS) estabilizadas con poli(etilenglicol) de 20, 45 y 100 nm de diámetro a CD de los ganglios linfáticos. Estas nanopartículas consisten en un núcleo gomoso reticulado de PPS rodeado por una corona hidrófila de poli(etilenglicol). El dominio de PPS es capaz de transportar fármacos hidrófobos y se degrada en entornos oxidativos. Las partículas de 20 nm fueron las que se captaron más fácilmente por los vasos linfáticos tras una inyección intersticial, mientras que tanto las nanopartículas de 20 como las de 45 nm presentaron una retención significativa en los ganglios linfáticos, mostrando una presencia constante e intensa a las 24, 72, 96 y 120 h después de la inyección. Las nanopartículas se internalizaron por hasta un 40-50% de las CD (y CPA) de los ganglios linfáticos sin el uso de un ligando de direccionamiento, y el sitio de la internalización se encontraba en los ganglios linfáticos más que en el sitio de inyección. Finalmente, se observó un aumento en CD (y otras CPA) que contenían nanopartículas a las 96 h con respecto a las 24 h, lo que sugiere una infiltración de estas células en los ganglios linfáticos. Por lo tanto, las nanopartículas de PPS de 20-45 nm tienen potencial para aplicaciones inmunoterapéuticas que se dirigen específicamente a CD de los ganglios linfáticos.

45 Sumario de la invención

Un nuevo enfoque, entre otros descritos en el presente documento, dirige específicamente sustancias terapéuticas a células presentadoras de antígenos (CPA) en una ubicación específica del cuerpo. Las CPA son típicamente células dendríticas y macrófagos y, en algunos casos, células B. En el presente documento, CPA es un término usado solo para describir células dendríticas y macrófagos, y excluye las células B. Aunque las CPA se extienden por todo el cuerpo, este enfoque dirige el agente a las CPA en una ubicación particular: el ganglio linfático. Las CPA se comportan de manera diferente en el ganglio linfático en comparación con otras partes del cuerpo, por lo que el ingreso del agente en esta ubicación es ventajoso. Además, el vehículo persiste a lo largo de horas o días, de forma que pueda lograr sus efectos, y también es biodegradable. El vehículo de administración del agente terapéutico no solo se dirige a las CPA en el ganglio linfático, sino que además activa las CPA de una forma específica: activando el sistema del complemento. La activación del sistema del complemento recurre a rutas conocidas de respuesta de tal forma que se pueden elegir los agentes inmunoterapéuticos apropiados. Además, el sistema del complemento es activado por materiales sintéticos del vehículo de administración sin involucrar agentes biológicos. El resultado de todas estas características dirigidas especialmente es un vehículo que genéricamente suministra un agente terapéutico a las CPA en un momento y un lugar en los que se activan las CPA para lograr la inmunoterapia deseada. El vehículo en sí no involucra moléculas biológicas ni polipéptidos, por lo que está listo para recibir cualquier agente sin que se provoque ningún conflicto, reacción cruzada ni antagonismo no deseados en el sistema inmunológico.

65 Este enfoque incluye, en algunas formas de realización, partículas que tienen propiedades físicas adecuadas y que están dimensionadas de forma que fluyan a través de los espacios intersticiales para penetrar en el sistema linfático. Las partículas que son demasiado grandes no migrarán de forma eficaz al sistema linfático. Dichas partículas

pueden fabricarse con polímeros sintéticos biodegradables y polímeros que activan el complemento. Dichas partículas pueden producirse mediante la reticulación de diversos polímeros conjuntamente y la disposición de determinados grupos funcionales que activan el complemento en una ubicación en las partículas que esté disponible para la activación del complemento. Todas estas características se describen en detalle a continuación.

5 Según la divulgación de la invención, una composición es una composición de nanopartículas que comprende: una colección aislada de partículas biodegradables sintéticas asociadas con un agente inmunoterapéutico y que comprende un primer polímero que activa el complemento y un segundo polímero reticulado covalentemente, en la que la colección tiene un diámetro medio de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 100 nm, el primer polímero carece de biomoléculas naturales que activan el complemento, y el primer polímero está fuertemente unido al segundo polímero.

15 Algunas formas de realización de la divulgación se refieren a un procedimiento para producir una composición inmunoterapéutica de nanopartículas que comprende la polimerización en emulsión de un primer polímero con un segundo polímero que es el emulsionante utilizado durante la polimerización para producir una colección de partículas biodegradables con un diámetro medio de entre aproximadamente 20 nm y aproximadamente 100 nm, seleccionándose el segundo polímero de forma que comprenda grupos funcionales hidroxilo que activan el complemento, y la asociación de un producto inmunoterapéutico con las partículas.

20 Algunas formas de realización de la divulgación se refieren a un procedimiento de administración de un agente inmunoterapéutico, comprendiendo el procedimiento la introducción en un paciente de una colección de partículas biodegradables sintéticas que se dirigen específicamente a células presentadoras de antígenos de los ganglios linfáticos, en el que las partículas comprenden un primer polímero que activa el complemento, la colección tiene un diámetro medio de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 100 nm, el primer polímero carece de biomoléculas naturales que activan el complemento, y las partículas comprenden un segundo polímero reticulado covalentemente que está fuertemente unido al primer polímero.

30 Algunas formas de realización de la divulgación se refieren a una composición de nanopartículas que comprende una colección aislada de partículas sintéticas que comprenden un polímero sintético que activa el complemento, en la que la colección tiene un diámetro medio de partícula, por ejemplo, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 100 nm. Las partículas pueden asociarse adicionalmente con un antígeno. El polímero sintético en algunas formas de realización carece de secuencias de aminoácidos o secuencias de sacáridos que activan el complemento, o carece completamente de aminoácidos y/o ácidos nucleicos y/o sacáridos. El polímero sintético puede incluir, por ejemplo comprende, una porción hidrófoba que está adsorbida en una porción hidrófoba de un segundo polímero biodegradable que forma el núcleo de la nanopartícula para unir así el polímero sintético al núcleo.

40 Algunas formas de realización de la divulgación se refieren a una composición de nanopartículas que comprende: una colección aislada de partículas sintéticas, en la que la colección tiene un diámetro medio de aproximadamente, por ejemplo, 10 nm a aproximadamente 100 nm, en la que las partículas comprenden un fármaco inmunosupresor, y en la que las partículas están asociadas adicionalmente con un antígeno. En algunas versiones, las partículas comprenden un copolímero de bloques anfífilico de al menos un bloque hidrófobo y al menos un bloque hidrófilo, en las que el copolímero de bloques se autoensambla en soluciones acuosas formando las partículas.

45 Breve descripción de las figuras

50 La figura 1 es un montaje fotomicrográfico que muestra una comparación de la captación de nanopartículas por los vasos linfáticos iniciales. Representa la microlinfangiografía de fluorescencia de la red capilar linfática en la piel de la cola de un ratón después de 90 minutos de infusión con nanopartículas de PPS cargadas con fluorescencia de (A) 20, (B) 45 y (C) 100 nm de diámetro. Las imágenes se tomaron mediante exposición constante. La red linfática hexagonal era claramente visible con las partículas de 20 nm. Barra = 100 μ m.

55 La figura 2 es un montaje fotomicrográfico que muestra la retención en los ganglios linfáticos de nanopartículas. Se muestran secciones de ganglios linfáticos de drenaje después de inyecciones en la cola del ratón con nanopartículas de PPS de 20, 45 y 100 nm. Los ganglios linfáticos se extrajeron a las 24, 72, 96 y 120 h después de la inyección. Había una fuerte presencia de las nanopartículas en todos los puntos temporales para las nanopartículas de 20 y 45 nm, pero no se observaron partículas de 100 nm en los ganglios linfáticos. Barra = 200 μ m.

60 La figura 3 es un montaje fotomicrográfico que muestra la ubicación de nanopartículas dentro del ganglio linfático. Se muestran secciones de ganglios linfáticos en serie a las 96 h después de la inyección de nanopartículas de PPS de 20 nm. Se identificaron células inmunitarias tal como se ha indicado con anticuerpos contra (A) CD3e (células T), (B) CD45R (células B) y (C) CD68 (macrófagos (Mac)) y células dendríticas (CD)). Las nanopartículas están claramente ausentes en las zonas de células T y células B, pero están fuertemente colocalizadas con macrófagos y CD. Barra = 100 μ m. (D) El marcador endotelial CD31 muestra la distribución de las nanopartículas (verde) con respecto a la arquitectura del seno de los ganglios linfáticos. Barra = 100 μ m.

5 La figura 4 es un montaje fotomicrográfico que muestra la internalización de las nanopartículas por macrófagos y células dendríticas (CD). Se muestran imágenes confocales de secciones de ganglios linfáticos a las 96 h después de la inyección de nanopartículas de PPS de 20 nm. (A) La tinción para CD68, expresado tanto por macrófagos como por CD, revela la internalización de las nanopartículas por estas células. (B) La tinción para Dec-205, que se encuentra exclusivamente en las CD, demuestra que las CD también internalizan las nanopartículas. Barra = 20 μ m.

10 La figura 5 presenta gráficos de barras que muestran la cuantificación de la absorción celular de nanopartículas (NP). Se utilizó un análisis de citometría de flujo para determinar la fracción de CPA (MHCII+) y CD (CD11c+) de ganglios linfáticos que internalizaron NP (FITC+). (A) A las 24 h, después de las inyecciones, más del 38% de las CPA y el 50% de las CD de los ganglios linfáticos habían internalizado nanopartículas de 20 nm. Se redujo la absorción en ambas poblaciones celulares con nanopartículas de 45 nm, y solo ~10% de todas las CPA absorbieron nanopartículas de 100 nm. (B) Después del pulsado *in vitro* CPA y CD con nanopartículas durante 24 h, casi todas las CPA y CD habían internalizado nanopartículas de los 3 tamaños. Por lo tanto, dado que los 3 tamaños de nanopartículas son igualmente absorbidos *in vitro*, las diferencias observadas a continuación en inyecciones *in vivo* son debidas más probablemente a las diferencias en la captación de nanopartículas por los vasos linfáticos después de la inyección. Estos resultados también indican que la absorción de nanopartículas tiene lugar en los ganglios linfáticos en lugar de por células presentes en sitios periféricos que después migran a los ganglios linfáticos.

20 La figura 6 es un (A) un montaje fotomicrográfico y un gráfico de barras (B) que muestran un aumento de la presencia de macrófagos y células dendríticas (CD) con el tiempo. Se muestran secciones de ganglios linfáticos teñidas para macrófagos (Mac) y CD (células CD68⁺) y núcleos a las 24 y 96 h después de la inyección de nanopartículas (NP) de PPS de 20 nm. La colocalización de Mac y CD aumentó a lo largo del tiempo. Barra = 100 μ m. (B) Se utilizó un análisis de citometría de flujo para determinar la fracción de células de ganglios linfáticos (GL) con nanopartículas (NP+) que eran CPA (MHCII+) y CD (CD11c+) a las 24 y 96 h después de la inyección de nanopartículas de 20 nm. Hay un aumento significativo en la fracción de células con nanopartículas que son CPA y CD a las 96 h con respecto a las 24 h. Además, parece que casi todas las CPA con nanopartículas a las 24 h son CD.

30 La figura 7 presenta gráficos que muestran un aumento en la expresión de marcadores de maduración de CD, CD86 y CD80, después de la internalización de nanopartículas (NP). (A) Un histograma típico de expresión de CD86 de CD (CD11c⁺) a las 24 h después de la inyección con PBS o partículas de 20 nm. Se observa un claro cambio en la expresión de CD86 para CD con nanopartículas (CD11c⁺FITC⁺). (B) Se determina que la fracción de células que expresan positivamente CD86 y CD80 es significativamente superior después de la internalización de nanopartículas. Además, se muestra que la expresión de CD86 y CD80 permanece en niveles más elevados a las 96 h después de la inyección.

40 La figura 8 presenta datos que muestran que PLURONIC F-127 se modifica de forma que los grupos OH terminales se convierten en grupos OCH₃ (A). (B) La incubación de nanopartículas activadoras del complemento estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, hidroxiladas) (OH-NP) con suero causa una mayor activación del complemento que las nanopartículas estabilizadas con PLURONIC terminado en metoxi (CH₃-NP) medida mediante las veces que aumenta C3a en suero +PBS.

45 La figura 9 presenta gráficos que muestran que la química de superficie de las nanopartículas dicta la respuesta de maduración de CD. Las nanopartículas activadoras del complemento estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, hidroxiladas) (OH-NP) de 25 nm maduran las CD en una medida mucho mayor que nanopartículas estabilizadas con PLURONIC terminado en metoxi (CH₃-NP) de 25 nm y nanoesferas de poliestireno carboxilado (COOH-NS) de 20 nm.

50 La figura 10 presenta gráficos que muestran que el tamaño de las nanopartículas dicta la respuesta de maduración de CD. Las nanopartículas activadoras del complemento estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, hidroxiladas) (OH-NP) de 25 nm inducen la maduración de CD, mientras que las nanopartículas activadoras del complemento estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, hidroxiladas) de 100 nm no lo hacen.

55 La figura 11 muestra un esquema químico para modificar nanopartículas y una microfotografía de las mismas en los ganglios linfáticos, en los que en (A) PLURONIC está funcionalizado con vinilsulfona (PL-VS). La vinilsulfona se puede unir después a las cisteínas libres de ovoalbúmina (OVA). La PL-VS-OVA se mezcla después con PLURONIC y se sintetizan nanopartículas de 25 nm como generalmente. (B) Las nanopartículas estabilizadas con PLURONIC conjugadas con OVA de 25 nm suministran OVA a los ganglios linfáticos.

60 La figura 12 presenta gráficos que muestran que las nanopartículas de PPS activadoras del complemento estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, hidroxiladas) conjugadas con OVA (OH-OVA-NP) de 25 nm inducen la maduración de la CD a niveles similares a los de OVA con LPS después de las inyecciones en ratones a las 24 horas.

65 La figura 13 presenta gráficos que muestran que las nanopartículas activadoras del complemento estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, hidroxiladas) conjugadas con OVA (OH-OVA-NP) de 25 nm causan la proliferación de

células T CD4 a los mismos niveles que la OVA con LPS después de la transferencia adoptiva de células T desde ratones OT-II.

La figura 14 presenta gráficos que muestran que las nanopartículas activadoras del complemento estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, hidroxiladas) conjugadas con OVA (OH-OVA-NP) de 25 nm, causan memoria en las células T CD8, medida a través de manchas de IFN- γ /células de ganglios linfáticos. *, P <0,05.

La figura 15 presenta gráficos que muestran los títulos de Ab (anticuerpo) de OVA a los 21 días. Las nanopartículas estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, hidroxiladas) conjugadas con OVA (OH-OVA-NP) de 25 nm producen títulos de Ab de OVA a niveles similares a los de OVA con LPS. Las nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC terminadas en metoxi conjugadas con OVA de 25 nm y las nanopartículas estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, hidroxiladas) conjugadas con OVA de 100 nm (OH-OVA-100) producen títulos de Ab más bajos. Las estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, hidroxiladas) conjugadas con OVA de 25 nm (OH-OVA-25) producen títulos de Ab más bajos en ratones C3-/-.

Descripción detallada de formas de realización preferidas

Introducción a la invención

Se pueden usar nanopartículas con propiedades adecuadas para dirigir específicamente sustancias terapéuticas a células presentadoras de antígenos (CPA), incluidas células dendríticas (CD), de los ganglios linfáticos. Los efectos del tamaño de las nanopartículas en la captación por los vasos linfáticos, la retención en los ganglios linfáticos y la internalización por CPA y CD de ganglios linfáticos se demuestran en el presente documento en respuesta a inyecciones intradérmicas en ratones (que tienen capilares linfáticos de tamaño similar a los de los humanos (10-80 μ m) aunque estos son muy variables en ambas especies [20, 42]). Aunque se puede utilizar una diversidad de tamaños de nanopartículas, las nanopartículas de aproximadamente 20 nm de diámetro son las que se captan con mayor facilidad y, además, se retienen en los ganglios linfáticos durante periodos de tiempo más largos (de hasta 120 h) que lo que se ha informado anteriormente para otras partículas [31-34, 36]. Se ha demostrado, sorprendentemente, que determinadas sustancias químicas de la superficie de las nanopartículas activan el complemento. Dentro del ganglio linfático, se ha demostrado que las nanopartículas activadoras del complemento son internalizadas de forma eficaz por las CPA residentes (células MHCII⁺ que incluyen CD y algunos macrófagos) y otros macrófagos no presentadores de antígenos (MHCII) sin un ligando de direccionamiento. Una gran fracción (hasta el 50%) de las CD residentes de los ganglios linfáticos internalizó las nanopartículas activadoras del complemento a 20 nm, y el número aumentó con el tiempo. Se encontró que la maduración de CD tuvo lugar después de la internalización de las nanopartículas activadoras del complemento.

El tamaño y la química de superficie son simultáneamente importantes: las nanopartículas activadoras del complemento que no están dimensionadas para penetrar en los vasos linfáticos con una eficacia determinada (por ejemplo, nanopartículas de 100 nm estabilizadas con PLURONIC) no son un adyuvante tan potente como las nanopartículas relativamente más pequeñas (por ejemplo, 25 nm) de la misma química, que tienen una mayor eficacia de penetración. Las nanopartículas no activadoras del complemento que están dimensionadas para penetrar fácilmente en los vasos linfáticos (por ejemplo, nanopartículas de PPS de 25 nm estabilizadas con PLURONIC terminado en metoxi) no son un adyuvante tan potente como las nanopartículas del mismo tamaño de una química de superficie que activa el complemento (por ejemplo, nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC de 25 nm). La activación del complemento desempeña un papel clave en el mecanismo, como lo demuestra la deficiente respuesta inmunitaria en animales C3-/- a los que se inyectó nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC de 25 nm acopladas a antígeno. Las nanopartículas hidroxiladas pequeñas (por ejemplo, 20-45 nm) (por ejemplo, nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC) ofrecen una estrategia para administrar agentes inmunoterapéuticos a las CD y otras CPA de los ganglios linfáticos.

Se pueden utilizar determinadas químicas de superficie para activar las CPA, incluidas las CD, y después inducir respuestas inmunitarias adaptativas dependientes de células T. Algunas superficies de material pueden activar la cascada del complemento, incluidas superficies hidroxiladas [117] o superficies hidroxiladas obtenidas mediante estabilización con PLURONIC [118]. Las superficies de los materiales pueden conjugarse con determinadas moléculas y biomoléculas hidroxiladas para activar el complemento. Por ejemplo, los expertos pueden aplicar las técnicas expuestas en el presente documento para realizar la conjugación. Además, los implantes, dispositivos médicos u otros vehículos, además de las nanopartículas, pueden recibir una capa de polímero activador del complemento tal como se describe en el presente documento, o los polímeros o los hidroxilos pueden introducirse directamente en dichos materiales. En el desarrollo de adyuvantes, el enfoque convencional utilizado por los científicos para activar células, tales como CD mediante activadores de los receptores tipo Toll, tales como lipopolisacárido (LPS). [119-121]. Pero se ha descubierto que determinadas químicas de superficie de las nanopartículas pueden activar un aspecto diferente de inmunidad innata, a saber, la cascada del complemento: los ejemplos detallados en el presente documento demuestran que las nanopartículas hidroxiladas, tales como las obtenidas mediante estabilización con PLURONIC, pueden activar el complemento, y que este a su vez puede activar CPA, incluidas CD, e inducir inmunidad humoral y celular dependiente de células T. En otro trabajo sobre nanopartículas como adyuvantes, que no emplea un mecanismo de complemento, el tamaño de las nanopartículas

poliméricas determinó la medida a la que alcanzaban CD y las activaban: con nanopartículas de poliestireno carboxilado, las nanopartículas de tamaño intermedio (45 nm) son absorbidas por CD y estas se activan, pero unas más pequeñas (20 nm) no [116]. Sin embargo, con las nanopartículas descritas en el presente documento, el complemento puede activarse y esto proporciona una potente señal para la activación de las CD y la inducción de aspectos humorales y celulares dependientes de las células T de la respuesta inmunitaria adaptativa.

Se sabe que la activación del complemento potencia la respuesta inmunitaria adaptativa, específicamente la inmunidad de células B. Trabajos anteriores han demostrado que las proteínas del complemento C3b y C3d pueden utilizarse como un adyuvante molecular para mejorar la inmunidad humoral dependiente de células B. La inmunización de ratones con una fusión de C3b o C3d para modelar antígenos muestra un aumento significativo en la respuesta de células B inmunitarias adquirida en comparación con el antígeno libre solo [134, 135]. El mecanismo con el que actúan los adyuvantes C3b y C3d puede ser a través de la unión directa del receptor C3d (CD21/35) que se asocia con CD19, un amplificador de la activación de células B conocido. Sin embargo, se ha encontrado que CD21/35 no siempre es necesario para esta respuesta de células B [136]. Una certeza de las fusiones C3b- y C3d-antígeno es que su capacidad adyuvante para la inmunidad humoral es a través de la interacción directa con las células B [137]. Esto es diferente a la inmunidad humoral dependiente de células T, que se produce cuando el antígeno es absorbido por las CD tal como se enseña en el presente documento, las CD maduran, las CD se procesan y presentan antígeno a través de MHC II a las células T CD4, las células T CD4 presentan antígeno a las células B, y finalmente las células B producen anticuerpos. Aunque se ha descubierto que el complemento está implicado en la inmunidad dependiente de células T, los mecanismos por los que tiene lugar esto no se han descrito [138]. Además, no se ha sugerido previamente que la activación del complemento pueda usarse como un adyuvante molecular para la inmunidad dependiente de células T.

Los sistemas descritos en el presente documento, sin embargo, describen cómo puede utilizarse la activación del complemento como un adyuvante molecular para la inmunidad dependiente de células T. Además, algunas formas de realización incluyen nanopartículas que activan el complemento a través de químicas de superficie de nanopartículas. Específicamente, por ejemplo, los resultados muestran que las nanopartículas de PPS activadoras del complemento estabilizadas con PLURONIC de 25 nm inducen la maduración de CD y muestran por primera vez que la activación del complemento a través de superficies hidroxiladas puede utilizarse como una señal de peligro para inducir la maduración de CD. También, tal como se describe en el presente documento, por primera vez se utiliza la activación del complemento por medio de nanopartículas estabilizadas con PLURONIC como adyuvante para la inducción de la inmunidad humoral y celular dependiente de células T mediada por CD.

Direccionamiento al sistema inmunológico

Las células presentadoras de antígenos (CPA) son células fagocíticas muy eficaces que utilizan MHC de clase I, II y otras moléculas coestimuladoras (es decir, CD86 y CD80) para estimular las células T vírgenes e inducir inmunidad mediada por células. Las CPA, que incluyen algunos macrófagos y las células dendríticas (CD) más potentes, están presentes en los tejidos periféricos en los que actúan como centinelas que, después de la internalización y el procesamiento de antígenos extraños, experimentan subsiguientemente una maduración y una migración a los ganglios linfáticos con el fin de presentar antígenos a las células T [1-3]. Con los papeles críticos que desempeñan las CPA y las CD en la inmunidad adaptativa, se están realizando varios experimentos para dirigir a estas células agentes inmunomoduladores, tales como ADN, proteínas y polipéptidos [4-14]. Polipéptido es un término que se refiere a dos o más aminoácidos unidos conjuntamente, e incluye proteínas.

Los sistemas de administración basados en polímeros y en liposomas se han centrado principalmente en el suministro de proteínas y ADN a CD periféricas, que en primer lugar internalizan los vehículos farmacológicos y luego migran a los ganglios linfáticos dentro de un periodo de ~1-2 días para activar las células T [9, 12, 13]. Hasta hace poco, no estaba claro si las CD inmaduras, capaces de absorber antígenos, estaban presentes en los ganglios linfáticos. No obstante, estudios recientes han establecido que una fracción sustancial de las CD residentes de los ganglios linfáticos son fenotípicamente inmaduras y capaces de internalizar antígenos y partículas en los mismos [15, 16]. Por lo tanto, tal como se explica en el presente documento, las CPA residentes de los ganglios linfáticos también pueden utilizarse como dianas para fármacos inmunoterapéuticos u otros agentes terapéuticos. Un beneficio potencial de dirigirse a las CPA o las CD de los ganglios linfáticos en lugar de a las de los sitios periféricos es que la presentación prematura del antígeno (es decir, una CD migratoria que expresa el antígeno en su superficie antes de alcanzar un ganglio linfático) a menudo puede conducir a tolerancia en las células inmunitarias [13, 17, 18]; por lo tanto, el suministro a las CPA de los ganglios linfáticos podría evitar este problema. Además, otros estudios de direccionamiento de las CD utilizan ligandos de direccionamiento conjugados como anti-Dec-205 y anti-CD11c para aumentar la especificidad de las CD [4, 5, 8, 9, 12, 19].

Sin embargo, lo que no se ha apreciado convencionalmente es que se puede explotar eficazmente el hecho de que las CD son por naturaleza muy fagocíticas y están presentes en los ganglios linfáticos en concentraciones elevadas. En consecuencia, se han desarrollado materiales y procedimientos para dirigirse específicamente a estas células en los ganglios linfáticos, tal como se explica en el presente documento, incluyendo el direccionamiento sin el uso de un ligando de direccionamiento. Un ligando de direccionamiento se refiere a un grupo químico que se une específicamente a un grupo químico particular presente en una célula, por ejemplo, un receptor de superficie celular

o una proteína de superficie celular. Por lo tanto, algunas formas de realización pueden dirigirse basándose en el tamaño y en otras propiedades físicas y se dirigen sin polipéptido exógeno, sin ligando exógeno, sin ácido nucleico exógeno, sin anticuerpo o fragmento del mismo, o sin ligando exógeno para cualquiera de: un receptor, una molécula de superficie celular, una molécula de matriz extracelular, un antígeno de superficie celular, una molécula marcadora de células o un polisacárido.

Con el fin de dirigirse a las CPA, incluidas las CD, presentes en los ganglios linfáticos, es útil, tal como se demuestra en el presente documento, diseñar vehículos de administración que puedan ser captados fácilmente por los vasos linfáticos y retenidos en ganglios linfáticos drenantes. Un vehículo de administración se refiere a un agente, por ejemplo, una partícula que suministra un agente terapéutico, por ejemplo, un antígeno o un fármaco inmunosupresor. Un papel primordial del sistema linfático es la captación de líquido y partículas del espacio intersticial como un componente pequeño pero importante de la microcirculación [20-23].

Otros estudios experimentales *in vivo* de direccionamiento linfático que utilizan liposomas y partículas poliméricas para investigar el sistema linfático han indicado que el tamaño de partícula puede ser un factor para la captación por los vasos linfáticos desde el espacio intersticial [21, 24-29]. Los liposomas mayores de 170 nm mostraron, en general, una captación deficiente por los vasos linfáticos y permanecieron en el sitio de la inyección, mientras que las partículas en el intervalo de 40-70 nm mostraron una captación significativa por parte de los vasos linfáticos [25].

Un estudio de este tipo que utiliza partículas de poliestireno carboxilado enseña que las partículas solo son útiles en la práctica en el intervalo estrecho de 40-50 nm, porque este tamaño es una señal de peligro reconocida por las CD; en consecuencia, las CD se activan en sitios dérmicos y no en los ganglios linfáticos [116]. Este estudio de perlas de poliestireno mostró que las perlas se acumulan en los ganglios linfáticos en tamaños intermedios (40 nm) más que en tamaños más pequeños (20 nm) y más grandes (> 100 nm) y enseñaron que 40-50 nm era el tamaño que se debería utilizar para las perlas. Más específicamente, este estudio mostró que se encontró que partículas muy pequeñas (20 nm) y partículas más grandes (100 nm) se acumulaban significativamente menos que partículas de 40 nm en células que fueron positivas para marcadores de CD, tal como se indica por el antígeno de CD DEC205 [116]. Los autores enseñan que las perlas de poliestireno de 40 nm causan la activación y la migración de CD presentes en sitios dérmicos a los ganglios linfáticos; por lo tanto, las perlas de 40 nm no podrían dirigirse a las CD residentes de los ganglios linfáticos.

Además, el estudio de perlas de poliestireno enseña que el tamaño de las perlas es una señal de peligro para las CD porque las CD han evolucionado para reconocer los intervalos del tamaño vírico. El tamaño de las perlas, por lo tanto, controlaría con éxito el direccionamiento a CD, reconociéndose el tamaño correcto de las perlas por las CD en la periferia y causando la activación de las CD. Esta enseñanza se encuentra en marcada contraposición con el uso exitoso de nanopartículas más pequeñas para la activación de CD (menos de aproximadamente 40 o aproximadamente 35 o aproximadamente 25 nm) tal como se describe en el presente documento. Esta enseñanza también se encuentra en contraposición con los resultados que se muestran en el presente documento de que la química de superficie es una señal de peligro, por ejemplo, como en las nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC que utilizan la química de superficie de hidroxilo para activar el complemento como una señal de peligro. Además, los resultados presentados en el presente documento relacionan el tamaño de partícula con la capacidad de direccionamiento a los ganglios linfáticos y no con el reconocimiento del tamaño por CD. Por ejemplo, las nanopartículas activadoras del complemento estabilizadas con PLURONIC de 25 nm fueron mejores que las nanopartículas activadoras del complemento estabilizadas con PLURONIC de 100 nm en la activación de CD y la inmunidad adaptativa de células T después de la inyección *in vivo*.

Las perlas de poliestireno carboxilado se utilizaron como un sistema de modelo experimental, al menos en parte, debido a que sus características de síntesis y de polimerización en emulsión convenientes dan lugar a una distribución de tamaño estrecha y controlable [116]. Las desventajas potenciales de su uso como un sistema terapéutico o profiláctico están asociadas con las perlas de poliestireno. Por ejemplo, no existe una ruta biológica por la que dichas partículas puedan degradarse y eliminarse del cuerpo. Por el contrario, un sistema biodegradable tal como se describe en el presente documento se degradará fácilmente y eficazmente dando un polímero soluble en respuesta a un entorno *in vivo*, por ejemplo, tal como en nanopartículas de PPS que se degradan en las condiciones oxidativas que se encuentran después de la endocitosis y el procesamiento. Aunque la degradación de las nanopartículas puede ser beneficiosa, no es necesariamente un requisito para su uso como adyuvante.

Las interacciones entre la superficie de la partícula y el intersticio pueden ser otro factor que desempeña un papel en la captación por los vasos linfáticos [30]. La estabilización estérica mediante el recubrimiento de liposomas y partículas con capas hidrófilas tales como poli(etilenglicol) (PEG) y sus copolímeros tales como PLURONICS (incluidos copolímeros de poli(etilenglicol)-bl-poli(propilenglicol)-bl-poli(etilenglicol)) puede reducir las interacciones no específicas con proteínas del intersticio, tal como se demuestra mediante la mejora de la captación por los vasos linfáticos después de inyecciones subcutáneas [21, 27, 31-35]. Todos estos hechos apuntan a la importancia de las propiedades físicas de las partículas en términos de captación por los vasos linfáticos.

Sin embargo, mientras que las partículas más pequeñas se captan más fácilmente, también se escapan más fácilmente del ganglio linfático; por lo tanto, lograr tanto una captación por los vasos linfáticos como una retención en

los ganglios linfáticos eficaces es significativo. En consecuencia, determinadas formas de realización de nanopartículas tienen características que abordan tanto la captación como la retención, tal como se evidencia a partir de los ejemplos y formas de realización expuestas en el presente documento. Con respecto al tamaño de las nanopartículas, por ejemplo, las investigaciones del sistema linfático indicaron que solo el 1-2% de los liposomas de 70 nm inyectados se retienen en los ganglios linfáticos posteriormente a las 12 h después de la inyección [30], y que la retención en los ganglios de liposomas grandes (> 70 nm) es más eficaz que de liposomas más pequeños [24, 29]. Esto aparentemente se debe en parte al hecho de que los macrófagos de los ganglios linfáticos fagocitan partículas más grandes de manera más eficaz. Aunque se asume convencionalmente que el recubrimiento de liposomas con protectores estéricos tales como PEG debería reducir la fagocitosis por macrófagos, se ha demostrado que dicho recubrimiento no afecta significativamente a la retención en los ganglios linfáticos [36]. También se ha asumido convencionalmente que la fagocitación de partículas en los ganglios linfáticos se realiza principalmente por macrófagos [21, 27, 29, 30, 32, 36, 37]. Con nanopartículas de poliestireno carboxilado, se encontró que las nanopartículas de 20 nm se absorbían mucho menos por las CD que las nanopartículas de 40 nm *in vivo* [116]. Por lo tanto, además de administrar medicamentos para su absorción por macrófagos, es ventajoso administrar medicamentos a los ganglios linfáticos para su absorción por otras CPA, incluidas las CD. Tal como se muestra a continuación, determinadas formas de realización de las partículas de la presente invención son, de hecho, absorbidas por CPA y/o CD incluso en tamaños pequeños al menos tan reducidos como 20 nm.

Estudios previos han sugerido que después de la absorción de antígenos, son necesarias "señales de peligro" biológicas potentes tales como citoquinas inflamatorias (es decir, el ligando CD40) para madurar las CD y subsiguientemente inducir inmunidad mediada por células [5, 12, 38]. Sin embargo, puede ser ventajoso renunciar a dichas señales. De hecho, en algunas formas de realización, son las propias nanopartículas que se usan como un estímulo de maduración las que evitan el uso de "señales de peligro" biológicas convencionales, por ejemplo, algunos polipéptidos, anticuerpos, secuencias de ácidos nucleicos. Estos resultados se evidencian en la respuesta de maduración de las CD que se observó después de la internalización de las nanopartículas *in vivo*.

Formulaciones de nanopartículas

Tal como se documenta en el presente documento, el tamaño está relacionado con la absorción y la retención de nanopartículas en los ganglios linfáticos. La captación por los vasos linfáticos, la retención en los ganglios linfáticos y la ubicación dentro de los ganglios linfáticos y entre las poblaciones de células de nanopartículas están documentadas en el presente documento. Un desafío que emplea los enfoques convencionales consiste en obtener tanto una captación por los vasos linfáticos como una retención en los ganglios linfáticos eficaces, dado que las propiedades de las nanopartículas, tales como el tamaño y las características de superficie, pueden tener efectos conflictivos. En general, las partículas más pequeñas presentan una mejor captación por los vasos linfáticos que las partículas más grandes, pero una menor retención en los ganglios linfáticos. Se divulgan nanopartículas con un tamaño de 5 nm a 100 nm de diámetro; los expertos apreciarán de inmediato que se contemplan todos los intervalos y valores dentro de los intervalos indicados explícitamente, por ejemplo, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80 nm. Se divulga que las nanopartículas se pueden producir en una colección de partículas que tenga un diámetro medio de 5 a 100 nm; los expertos apreciarán de inmediato que se contemplan todos los intervalos y valores dentro de los intervalos indicados explícitamente, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 70 nm. Según la invención, la colección tiene un diámetro medio de partícula de 20 nm a 70 nm. La distribución de tamaño de dicha colección de partículas puede controlarse de forma que un coeficiente de variación (desviación estándar dividida por el tamaño de partícula promedio) alrededor de un diámetro medio de una colección de partículas puede ser inferior a aproximadamente 50, aproximadamente 35, aproximadamente 20, aproximadamente 10, o aproximadamente 5 nm. [39]; los expertos apreciarán de inmediato que se contemplan todos los intervalos y valores dentro de los intervalos indicados explícitamente.

Las propiedades físicas también están relacionadas con la utilidad de una nanopartícula después de su captación y su retención en los ganglios linfáticos. Estas incluyen propiedades mecánicas tales como rigidez o gomosidad. Según la invención, las formas de realización se basan en un núcleo gomoso, por ejemplo, un núcleo de poli(sulfuro de propileno) (PPS) con una capa superpuesta, por ejemplo, una capa superpuesta hidrófila, tal como PEG, tal como en el sistema PPS-PEG recientemente desarrollado y caracterizado para la administración sistémica (pero no dirigida o inmunitaria) [39, 40]. El núcleo gomoso se encuentra en contraposición con un núcleo sustancialmente rígido tal como en un sistema de nanopartículas de poliestireno o metálicas. El término gomoso se refiere a determinados materiales resilientes además de cauchos naturales o sintéticos, siendo gomoso un término familiar para los expertos en las técnicas de polímeros. Por ejemplo, se puede utilizar PPS reticulado para formar un núcleo gomoso hidrófobo. El PPS es un polímero que se degrada en condiciones oxidativas en polisulfóxido y finalmente en polisulfona [41], pasando de esta forma de un caucho hidrófobo a un polímero hidrófilo soluble en agua [39]. Otros polímeros de sulfuro se pueden adaptar para su uso, refiriéndose la expresión polímero de sulfuro a un polímero con un azufre en el esqueleto polimérico. Otros polímeros gomosos que pueden utilizarse son poliésteres con una temperatura de transición vítrea en condiciones hidratadas que es inferior a aproximadamente 37 °C. Según la invención, se utiliza un núcleo hidrófobo con una capa superpuesta hidrófila, ya que el núcleo y la capa superpuesta tienden a no mezclarse, de tal forma que la capa superpuesta tiende a expandirse estéricamente más allá del núcleo. Un núcleo se refiere a una partícula que tiene una capa sobre la misma. Una capa se refiere a un material que cubre al menos una porción del núcleo. Una capa puede estar adsorbida o unida covalentemente. Una partícula

o un núcleo puede ser sólido o hueco. Los núcleos hidrófobos gomosos son más ventajosos frente a los núcleos hidrófobos rígidos, tales como núcleos cristalinos o vítreos (como en el caso del poliestireno), ya que las partículas pueden transportar cargas más altas de fármacos hidrófobos con los núcleos gomosos hidrófobos.

5 Otra propiedad física es la hidrofiliidad de la superficie. Un material hidrófilo tiene una solubilidad en agua de al menos 1 gramo por litro cuando no está reticulado. La estabilización estérica de partículas con polímeros hidrófilos puede mejorar la captación desde el intersticio reduciendo interacciones no específicas; no obstante, la naturaleza encubierta aumentada de las partículas también puede reducir la internalización por parte de células fagocíticas en los ganglios linfáticos. Sin embargo, el desafío de equilibrar estas características contrapuestas se ha cumplido, y la
10 presente solicitud documenta la creación de nanopartículas para su suministro eficaz mediante los vasos linfáticos a las CD y otras CPA de los ganglios linfáticos. Por lo tanto, algunas formas de realización incluyen un componente hidrófilo, por ejemplo, una capa de material hidrófilo. La invención divulga que los ejemplos de materiales hidrófilos adecuados son uno o más de entre poli(óxidos de alquileo), poli(óxidos de etileno), polisacáridos, poli(ácidos acrílicos) y poliéteres según la invención. El peso molecular de los polímeros en una capa puede ajustarse para
15 proporcionar un grado útil de impedimento estérico *in vivo*, por ejemplo, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 100.000 o incluso superior; los expertos apreciarán de inmediato que se contemplan todos los intervalos y valores dentro de los intervalos indicados explícitamente, por ejemplo, entre 10.000 y 50.000. Los ejemplos incluyen una partícula con una superficie hidrófila que es un PEG derivado de un PLURONIC que se utilizó como estabilizante durante la síntesis como una emulsión.

20 Las nanopartículas pueden incorporar grupos funcionales para una reacción adicional. Los grupos funcionales para la reacción adicional incluyen electrófilos o nucleófilos; estos son convenientes para hacerlos reaccionar con otras moléculas. Ejemplos de nucleófilos son aminas primarias, tioles e hidroxilos. Ejemplos de electrófilos son ésteres de succinimidilo, aldehídos, isocianatos y maleimidias. Por ejemplo, utilizando nanopartículas de PPS-PLURONIC, por
25 ejemplo, las partículas se sintetizan tal como se describe en el ejemplo 1 con la diferencia de que el 2% del PLURONIC está reemplaza por PLURONIC derivado de OVA/OVA₂₅₇₋₂₆₄/OVA₃₂₃₋₃₃₉. Se utiliza una cantidad total del 1,5% de PLURONIC. El tiempo de reacción se reduce a 2 h y la base se añade en una relación equimolar de 1:1 a tioles iniciadores para reducir la exposición de la proteína o los péptidos a condiciones básicas durante la síntesis de nanopartículas. Este esquema es solo un procedimiento ejemplar para la funcionalización de PEG; se pueden utilizar
30 otros diversos enfoques dependiendo de la proteína o el péptido que se está conjugando [111].

Las nanopartículas también pueden incorporar grupos funcionales o motivos para la activación del complemento. Un grupo funcional preferido es hidroxilo, que es particularmente eficaz para la activación del complemento tal como se documenta en el presente documento. Otros grupos funcionales que son nucleófilos pueden reaccionar con el
35 tioéster en C3. Se demuestra en el presente documento que las superficies de nanopartículas hidroxiladas son particularmente útiles en el direccionamiento a CPA, incluidas CD, del ganglio linfático. En el caso de las nanopartículas de PPS de los ejemplos expuestos en el presente documento, la hidroxilación se obtuvo mediante estabilización con PLURONIC terminado en grupos hidroxilo. Cuando estos grupos hidroxilo se convirtieron en grupos metoxi para bloquear el grupo hidroxilo, las nanopartículas no funcionaron bien como adyuvantes. Cuando
40 las nanopartículas hidroxiladas se sometieron a ensayo en ratones C3^{-/-}, su efecto adyuvante disminuyó enormemente. Estos resultados, combinados con mediciones descritas en los ejemplos de la activación de C3 expuestos en el presente documento, demuestran la utilidad particular de dirigirse a las CPA, incluidas las CD, con nanopartículas activadoras del complemento. Por consiguiente, en algunas formas de realización, las nanopartículas dependen solo del OH para activar el complemento y se excluyen uno o más de: cationes a pH 7,0-7,4, aminas,
45 aminas primarias, aminas secundarias, aniones a pH 7,0-7,4, tioles, iones dipolares a pH 7,0- 7,4; alternativamente, dichos grupos están presentes en la nanopartícula, pero es una capa de polímero en la nanopartícula la que excluye uno o más de dichos grupos. Alternativamente, la nanopartícula y/o la capa no poseen ningún grupo capaz de formar un ion a un pH de 7,0 a 7,4, excepto OH.

50 Se pueden ubicar grupos funcionales en la partícula según sea necesario para su disponibilidad. Una ubicación puede ser como grupos laterales o terminales en el polímero central o polímeros que son capas sobre un núcleo o polímeros unidos a la partícula de otra forma. Según la invención, se incluyen ejemplos en el presente documento que describen que el PEG estabiliza las nanopartículas que se pueden funcionalizar fácilmente para un
55 direccionamiento celular específico o la administración de fármacos de proteínas y péptidos.

Se pueden utilizar polímeros biodegradables para producir todos o algunos de los polímeros y/o partículas y/o capas. Biodegradable se refiere a polímeros que están sujetos a degradación por hidrólisis espontánea, ataque
60 químico mediante enzimas que escinden secuencias específicas de aminoácidos o mediante la incorporación de grupos funcionales que son sensibles a la oxidación. Los polímeros sujetos a hidrólisis espontánea se degradarán *in vitro* en solución acuosa mantenida a un pH de 7,0 a 7,4 como resultado de grupos funcionales que reaccionan con el agua en la solución. El término "degradación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a volverse soluble, ya sea por reducción del peso molecular (como en el caso de un poliéster) o por conversión de grupos hidrófobos en grupos hidrófilos (como en el caso de PPS). Los polímeros con grupos éster están generalmente sujetos a hidrólisis espontánea, por ejemplo, polilactidas y poliglicólidos. Se conocen muchas secuencias peptídicas
65 sujetas a ataque enzimático específico, por ejemplo, tal como degradadas por colagenasas o metaloproteinasas: las secuencias que se degradan meramente por mecanismos de radicales libres biológicos no se degradan

específicamente. Los polímeros con grupos funcionales que son sensibles a la oxidación se alterarán químicamente por medio de agentes oxidantes suaves, siendo un ensayo para los mismos la solubilización mejorada por exposición a peróxido de hidrógeno al 10% durante 20 h *in vitro*. Por ejemplo, el PPS es un polímero sensible a la oxidación [39].

5 Aunque se utilizaron partículas de PPS como un sistema ejemplar para demostrar cómo fabricar y utilizar las nanopartículas, se pueden utilizar materiales alternativos. En general, las características para cada componente del sistema de partículas pueden mezclarse y combinarse libremente según venga guiado por la necesidad de producir una partícula funcional. Por ejemplo, pueden utilizarse otras partículas que son pequeñas (por ejemplo, inferiores a aproximadamente 100 nm o inferiores a aproximadamente 70 nm) y, por lo tanto, penetran en la circulación linfática de forma eficaz. Dichas partículas pueden injertarse opcionalmente con una capa superpuesta de PEG, o incorporar de otra forma a las mismas un polímero hidrófilo, y opcionalmente pueden injertarse con un antígeno, señales de peligro, o ambos. Por ejemplo, un copolímero de bloque que contiene PEG se puede adsorber en una nanopartícula polimérica degradable de tamaño apropiado, y el antígeno se puede unir posteriormente a la superficie de dicho polímero tratado. Como otro ejemplo, un copolímero de bloque que contiene PEG puede adsorberse en una nanopartícula inorgánica de tamaño apropiado, y el antígeno puede unirse posteriormente a la superficie de dicho polímero tratado. Si bien la degradación del núcleo de las nanopartículas puede ser deseable, no es estrictamente necesaria.

20 Los sistemas micelares también pueden presentar las mismas características útiles que se han descrito anteriormente, incluidas las micelas formadas a partir de copolímeros de bloques AB y ABA de poli(etilenglicol) y PPS [100-104]. Cuando dichos copolímeros se forman con una fracción molecular de poli(etilenglicol) que es relativamente elevada, por ejemplo, con un exceso de aproximadamente el 40%, se puede esperar que se formen micelas esféricas en determinadas condiciones. Estas micelas pueden ser pequeñas, cumpliendo, por ejemplo, con el tamaño mencionado anteriormente para su incorporación a los vasos linfáticos, y pueden estar injertadas opcionalmente con una capa superior de PEG, o incorporar de otra forma PEG u otros polímeros para lograr propiedades similares. Además, pueden conjugarse con un antígeno, tal como se enseña en el presente documento, señales de peligro, o ambos, en la superficie de la micela. El copolímero de bloque puede terminar en un grupo hidroxilo, para la activación del complemento, y es particularmente beneficioso que el bloque hidrófilo termine en un grupo hidroxilo, de forma que este grupo hidroxilo esté más fácilmente disponible en la superficie de la nanopartícula micelar para su unión al complemento. Dichas superficies hidroxiladas de esta forma pueden diseñarse para que activen eficazmente el complemento. Un bloque hidrófilo particularmente útil es PEG, terminado en un grupo hidroxilo. Además de las arquitecturas de polímeros formadores de micelas, se pueden seleccionar tamaños de bloque y relaciones de tamaño de bloque para formar estructuras vesiculares. También existe una serie de otras posibles composiciones químicas de formulaciones micelares que pueden usarse [105-108].

Algunos sistemas de polímeros están en sí mismos nanoparticulados y están incluidos en el término nanopartículas. Por ejemplo, los dendrímeros son una clase de polímeros que pueden estar nanoparticulados en el rango de 10 nm [141]. Estos polímeros comprenden un gran número de grupos funcionales en su superficie, por ejemplo, que se han utilizado para conjugarse a biomoléculas y otros grupos [142, 143]. Análogamente, el antígeno podría conjugarse con la superficie de un dendrímero. Además, los grupos funcionales presentes en la superficie del dendrímero podrían optimizarse para la activación del complemento, por ejemplo, mediante hidroxilación. Se ha demostrado que algunos complejos de dendrímero-ADN activan el complemento [144, 145]. Por lo tanto, los dendrímeros representan una interesante química nanoparticulada que podría adaptarse para el direccionamiento a los vasos linfáticos utilizando las técnicas descritas en el presente documento, para la conjugación de antígenos y para la activación del complemento, por ejemplo, tal como en las publicaciones de patente de Estados Unidos N° 2004/0086479, 2006/0204443 y en las patentes de Estados Unidos N° 6.455.071 y 6.998.115.

Por otra parte, los dendrímeros tienen una forma que es muy dependiente de la solubilidad de sus polímeros componentes en un entorno determinado, y pueden cambiar drásticamente según el disolvente o los solutos que lo rodean, por ejemplo, cambios en la temperatura, pH, contenido de iones o después de la absorción por una CD. Por el contrario, las nanopartículas que tienen dimensiones físicas que son relativamente más estables que los dendrímeros u otros sistemas de polímeros apenas ramificados pueden ser útiles para propósitos de almacenamiento o con respecto a su actividad biológica, por ejemplo, un núcleo sólido con una corona hidrófila presentará sistemáticamente la corona a su entorno. Por consiguiente, algunas formas de realización de nanopartículas se basan en partículas que no son dendrímeros, o que tienen un núcleo que es un sólido y/o tienen un núcleo que es un hidrogel reticulado. Una nanopartícula basada en PPS no es un dendrímero y tiene un núcleo sólido.

60 Inmunoterapia con nanopartículas

En uso, dichas nanopartículas son útiles como, por ejemplo, vehículos de administración de antígeno y fármaco para su direccionamiento a las CPA, específicamente las CD, de los ganglios linfáticos. La capacidad de suministrar antígenos y/o medicamentos y/o señales de peligro a las CD de los ganglios linfáticos es un enfoque útil para inmunoterapia. La capacidad de dirigirse a las CD y otras CPA de los ganglios linfáticos de forma eficaz con nanopartículas proporciona un procedimiento para la administración de proteínas y polipéptidos antigénicos y ácidos

nucleicos que codifican antígenos. Dado que las CD están involucradas de forma crítica en el inicio de la inmunidad mediada por células mediante la presentación de antígenos a las células T, este enfoque de administración puede utilizarse para diversas aplicaciones de vacunas y de inmunoterapia. Además, las nanopartículas son útiles como herramientas de diagnóstico (por ejemplo, toma de imágenes), herramientas de investigación (por ejemplo, tal como se comercializan en los catálogos ALDRICH o para visualización utilizando microscopios), o para la administración o la visualización de fármacos *in vitro* (por ejemplo, absorción por CPA y/o CD y/o macrófagos *in vitro* de fármacos o agentes de imagen).

El antígeno y/o los medicamentos y/o las señales de peligro pueden unirse covalentemente a las partículas, adsorberse en las partículas, cargarse en las partículas o mezclarse con una colección de partículas para su introducción contemporánea en un paciente. Los motivos para la unión covalente se explican en otra parte del presente documento, y también se pueden aplicar en este caso. La adsorción se puede lograr mezclando el agente y las partículas durante un periodo de tiempo predeterminado y después separando físicamente las partículas de la mezcla, por ejemplo, mediante centrifugación o filtración. La separación puede tener lugar antes o después de la administración, *in vitro* o en el cuerpo, por ejemplo, inyectando la mezcla y permitiendo que las fuerzas de difusión y de convección separen los componentes. La carga se puede realizar durante o después de la síntesis de partículas. Por ejemplo, las partículas pueden polimerizarse en presencia del agente, que quedará atrapado, ya sea por adsorción o por separación de fases tal como en una polimerización basada en micelas. La carga después de la síntesis puede realizarse según sea necesario, por ejemplo, exponiendo las partículas a un agente en un primer disolvente que hincha las partículas o permite una fácil difusión del agente y después exponiendo las partículas a un segundo disolvente que contrae las partículas o las restaura a una solución acuosa que detiene o retarda la difusión del agente, por ejemplo: cargando un medicamento hidrófobo en un disolvente orgánico y almacenando las partículas en una solución acuosa. El mezclado para la introducción concomitante se puede realizar, por ejemplo, introduciendo las partículas en una jeringa que tiene una solución de antígeno y/o fármacos y/o señales de peligro e inyectándolas conjuntamente en un paciente.

Inmunoterapia con nanopartículas y fármacos inmunosupresores

La inmunosupresión es una forma crítica de inmunoterapia que es muy necesaria en situaciones de trasplante clínico (por ejemplo, aloinjertos) y enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, esclerosis múltiple). El uso de fármacos inmunosupresores tales como corticosteroides (por ejemplo, ciclosporina A) y rapamicina ha dado lugar a grandes avances en el tratamiento de estos trastornos inmunitarios [122]. En general, se considera que las células T son dianas importantes de los fármacos inmunosupresores, que actúan inhibiendo los genes de las citocinas inflamatorias, principalmente IL-2 y TNF- γ , y por lo tanto reducen la proliferación de células T. Otro enfoque de inmunosupresión que se está desarrollando es el uso de anticuerpos para bloquear los receptores de células T CD28 y CD40 [123]. El bloqueo de estos receptores produce una activación insuficiente por medio de moléculas coestimuladoras ubicadas en las CD y, por lo tanto, causa un efecto de tolerancia que aborta de forma eficaz la proliferación de células T. Sin embargo, el tratamiento con corticosteroides o anticuerpos bloqueadores es muy inespecífico y puede provocar efectos secundarios tales como la reducción de la capacidad del sistema inmunitario para combatir otras infecciones. Por lo tanto, una estrategia para una inmunosupresión más específica, una que induzca una tolerancia específica al antígeno, sería un avance excepcional en inmunoterapia.

Recientemente se ha descubierto que las CD pueden ser una diana para inmunosupresión; Además de su capacidad para estimular la inmunidad de las células T, las CD también son capaces de regular la tolerancia de las células T [124]. La dexametasona (Dex) es un glucocorticoide sintético utilizado para la inmunosupresión en aplicaciones tales como la prevención del rechazo de trasplantes de aloinjerto. Tradicionalmente, se ha pensado que los glucocorticoides actúan únicamente sobre las células T. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la Dex puede actuar sobre las CD para regular a la baja la expresión de las moléculas coestimuladoras y la secreción de citoquinas inflamatorias [125,126]. Esto tiene implicaciones sustanciales para el potencial de utilizar CD para la inducción de tolerancia. Una CD que presenta antígeno a las células T en ausencia de moléculas coestimuladoras inducirá anergia en células T o tolerancia al antígeno presentado.

Se pueden administrar fármacos inmunosupresores con las nanopartículas. En algunas formas de realización, el antígeno puede dirigirse eficazmente a las CD de los ganglios linfáticos en virtud de su tamaño y su interacción con flujos intersticiales y su introducción en los vasos linfáticos. La administración de un antígeno y al mismo tiempo que los inmunosupresores para prevenir la activación de CD conduciría a tolerancia. En dichos casos, las nanopartículas que no activan el complemento pueden ser beneficiosas. Algunos de los principales fármacos inmunosupresores son los glucocorticoides, que son hidrófobos y pueden cargarse en el núcleo de PPS hidrófobo de las nanopartículas. Se ha demostrado que determinados glucocorticoides tales como dexametasona, tacrolimus y ciclosporina A inhiben la maduración y la capacidad aloestimuladora de las CD al disminuir la expresión de moléculas coestimuladoras (es decir, CD80 y CD86) y la secreción de citoquinas inflamatorias (es decir, IL-6) y TNF- α [125-131].

En las nanopartículas descritas en el presente documento pueden cargarse fármacos inmunosupresores e introducirse en un paciente. Las nanopartículas pueden dirigirse específicamente al sistema linfático y los ganglios linfáticos, y pueden estar específicamente dirigidas a su absorción por CPA y/o CD. Pueden administrarse ventajosamente fármacos hidrófobos u otros agentes utilizando nanopartículas con componentes o núcleos

hidrófobos. Además, un antígeno puede administrarse en combinación con un fármaco. El antígeno puede estar asociado con una nanopartícula, por ejemplo, mediante coinyección, adsorción o enlace covalente.

Por ejemplo, una estrategia consiste en cargar fármacos inmunosupresores hidrófobos (por ejemplo, Dex) en el núcleo de nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC terminado en metoxi (por lo tanto no hidroxiladas y no activadoras de complemento) y antígeno de injerto en la superficie. Por lo tanto, al administrar Dex u otros fármacos inmunosupresores junto con el antígeno a las CD de los ganglios linfáticos, es posible regular a la baja las moléculas coestimulantes pero aún así suministrar el antígeno y, a su vez, causar tolerancia específica al antígeno. Por lo tanto, pueden utilizarse nanopartículas, por ejemplo, nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC terminado en metoxi, con la combinación de conjugación de antígeno y carga de fármaco inmunosupresor, para inducir tolerancia para aplicaciones tales como tratamiento para enfermedades autoinmunitarias y rechazos de trasplantes.

Inmunoterapia con nanopartículas y antígenos

Las CPA que internalizan antígenos proteicos pueden procesar y presentar el epítipo del péptido antigénico a través de las rutas MHC-I y II. Un enfoque inmunoterapéutico implica la unión covalentemente de uno o más antígenos a una nanopartícula, o su asociación a la misma de otra forma. Los antígenos son polipéptidos sin o con glicosilación que pueden ser reconocidos por un sistema inmunológico, y generalmente tienen una longitud de al menos aproximadamente tres aminoácidos. Los antígenos también pueden codificarse por medio de secuencias de ácido nucleico tales como ADN o ARN. Por ejemplo, el ADN puede codificar un antígeno si codifica un antígeno polipeptídico presente en patógenos. Después del suministro del ADN a los núcleos de las CPA, se produciría la expresión del antígeno del polipéptido antigénico y su presentación en MHC I. Se pueden utilizar proteínas completas, pero se pueden utilizar fragmentos antigénicos, de forma que se pueden utilizar polipéptidos que tengan entre aproximadamente 3 y aproximadamente 20 residuos; los expertos apreciarán de inmediato que se contemplan todos los intervalos y valores dentro de los intervalos indicados explícitamente, por ejemplo, menos de aproximadamente 10 residuos. Dado que se pueden usar nanopartículas que activan directamente el sistema del complemento sin involucrar un polipéptido, se pueden utilizar antígenos que no activan el sistema del complemento.

Se pueden utilizar antígenos para inmunoterapia contra muchas enfermedades diferentes. Una aplicación específica es para inmunoterapia tumoral. Los antígenos útiles se presentan en células tumorales pero no en células sanas. Se han identificado diversos antígenos que son específicos de determinados tipos de tumores, tales como Caspasa-8, MAGE-1, Tirosinasa, HER-2/neu y MUC-1 [112]. Teniendo esto en cuenta, se pueden utilizar nanopartículas para suministrar dichos antígenos a CD de los ganglios linfáticos como un medio para activar células T para atacar tumores. Otra aplicación es la prevención frente a enfermedades infecciosas. La exposición a antígenos puede crear resistencia contra dichas enfermedades o actuar como una vacuna para diversas afecciones.

Inmunoterapia con nanopartículas y ácidos nucleicos

Algunas colecciones de nanopartículas pueden incluir nanopartículas y ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN o ARN, que codifican un antígeno. Además, estas también pueden incluir un casete de expresión, incluir un promotor o un potenciador, ser parte de un vector, o incorporar de otra forma motivos de entrega génica tal como se sabe en estas técnicas; véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 7.160.695, 7.157.089, 7.122.354, 7.052.694, 7.026.162, 6.869.935. Además, las secuencias pueden codificar otras biomoléculas terapéuticas. Los antígenos de ácidos nucleicos tales como ADN se pueden unir a nanopartículas (por ejemplo, la superficie de nanopartículas de PPS estabilizadas con Pluronic) tal como se describe para antígenos y otros agentes en el presente documento. Y, por ejemplo, la conjugación de ADN-polímero se puede realizar mediante adsorción electrostática, biotinylation de polímero [139]. Existen otras diversas estrategias de conjugación química para unir polímeros al ADN, que pueden adaptarse para su uso en el presente documento [140]. Utilizando las nanopartículas descritas en el presente documento, las CPA, incluidas las CD, de los ganglios linfáticos pueden ser una diana para la expresión génica del antígeno, así como activarse para asegurar la estimulación apropiada de células T.

Conjugación de antígeno

Están disponibles una diversidad de esquemas para unir antígenos a grupos funcionales nucleófilos o electrófilos. En general, dichos esquemas pueden adaptarse para la unión de fármacos o señales de peligro, según sea apropiado.

A modo de ejemplo, se proporciona la unión de antígenos a PLURONIC en las nanopartículas de PPS de los ejemplos. La conjugación de antígenos a nanopartículas de PPS se puede llevar a cabo mediante la funcionalización de la superficie de PLURONIC (un copolímero de bloque de PEG y PPG) con proteínas o péptidos. Se utilizaron Pluronic F127 (Sigma), divinilsulfona (Fluka), hidruro de sodio (Aldrich), tolueno (VWR), ácido acético (Fluka), dietiléter (Fisher), diclorometano (Fisher) y Celite (Macherey Nagel) tal como se recibieron. La reacción se llevó a cabo en atmósfera de argón (Messer). Se midió la RMN de ¹H en cloroformo deuterado (Armar) y los desplazamientos químicos (δ) se proporcionan en ppm con respecto a la señal del patrón interno tetrametilsilano (Armar) a 0,0 ppm. Una solución de 15 g (1,18 mmol) de Pluronic F-127 en 400 ml de tolueno se secó mediante

destilación azeotrópica durante 4 h utilizando una trampa Dean-Stark. La solución se enfrió en un baño de hielo y se añadieron 0,283 g (11,8 mmol) de hidruro de sodio. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos y se añadieron rápidamente 3,55 ml (35,4 mmol) de divinilsulfona (Sigma-Aldrich). Después de agitar en la oscuridad durante 5 días a temperatura ambiente, la reacción se detuvo añadiendo 1,35 ml (23,6 mmol) de ácido acético. Después de filtrar a través de celite y concentrar el filtrado a presión reducida hasta un volumen pequeño, el producto se precipitó en 1 litro de dietiléter helado. El sólido se retiró por filtración, se disolvió en una cantidad mínima de diclorometano y se precipitó en dietiléter helado cuatro veces en total. El polímero se secó al vacío para producir 6,0 g y se almacenó en atmósfera de argón a -20 °C antes de la conjugación con OVA. La RMN mostró la presencia de vinilsulfona y el grado de funcionalización fue del 88%. δ = 1,1 (m, CH₃, PPG), 3,4 (m, CH, PPG), 3,5 (m, CH₂, PPG), 3,6 (PEG), 6,1 (d, CH_{cis}=CH-SO₂) y 6,4 (d, CH_{trans}=CH-SO₂), 6,85 (dd, CH₂=CHSO₂-).

Después pueden conjugarse antígenos peptídicos o proteicos a PLURONIC-vinilsulfona (VS). Una proteína modelo para investigar la presentación del antígeno por CD es la ovoalbúmina (OVA). La OVA posee los péptidos antigénicos OVA₂₅₇₋₂₆₄ y OVA₃₂₃₋₃₃₉ que son procesados por CD a través de las rutas MHCI y II, respectivamente. OVA₂₅₇₋₂₆₄ y OVA₃₂₃₋₃₃₉ se conjugan con residuos de cisteína mediante el uso de un sintetizador de péptidos. Los péptidos se conjugan a continuación con PLURONIC-VS mediante reacción con sus tioles de cisteína. Se solubilizan 18 mg de péptido en 6,43 ml de tampón de fosfato de sodio 0,1 M a pH 8,5 para proporcionar una solución 2 mM. Se añaden 60 mg (1,68 mM) de PLURONIC-VS. La mezcla se agita durante 3 h y se toman partes alícuotas para la detección de tiol por Ellman cada 15-30 min. Se solubilizan 4 mg de reactivo de Ellman (5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico)) en 1 ml de fosfato de sodio 0,1 M y EDTA 1 mM (para quelar iones metálicos divalentes, que pueden oxidar sulfhidrilos) a pH 8,5. Se mezclan 15 μ l con 1,5 ml de fosfato de sodio 0,1 M y 30 μ l de la mezcla de reacción desactivada con 120 μ l de fosfato de sodio a pH 7. Después de mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos, se mide la absorbancia a 412 nm. La cantidad de tioles se calcula como: $c = \text{Abs}/E * D$, con E (factor de extinción) = 14150 M⁻¹ y siendo D un factor de dilución. El PLURONIC se dializó contra agua a través de una membrana de MWCO de 6-8 kDa y la solución se liofilizó. El rendimiento es de ~88% con la conversión completa de los grupos vinilsulfona tal como se confirmó mediante RMN de ¹H. La conjugación de OVA a PLURONIC-VS se realiza mediante una estrategia similar utilizando tioles de cisteína libres y aminas de lisina [109-111]. El péptido/proteína PL-VS-OVA se almacena a continuación a -20 °C hasta que se use para la síntesis de nanopartículas.

El antígeno puede conjugarse con las nanopartículas por otros medios, incluidos conjugación covalente con aminoácidos que son exógenos con respecto al antígeno polipeptídico natural, conjugación covalente con aminoácidos que son endógenos con respecto al antígeno natural, adsorción fisicoquímica y otros medios.

35 Inmunoterapia con nanopartículas y señales de peligro

Otro enfoque de inmunoterapia implica la aplicación de señales de peligro. Los resultados expuestos en el presente documento muestran que las nanopartículas de PPS activadoras del complemento estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, hidroxiladas) proporcionan la función de una señal de peligro o estímulo que madura las CD tal como se evidencia mediante el aumento en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD86 y CD80. Aunque las nanopartículas no requieren una señal de peligro o de maduración no complementaria, en algunos casos la adición de dicha señal puede ayudar adicionalmente en el desarrollo de una respuesta inmunológica. Otros estudios de direccionamiento a CD han sugerido que después de la absorción de antígenos, son necesarias señales de peligro tales como citoquinas inflamatorias (es decir, ligando de CD40) y/o activadores de los receptores tipo Toll (por ejemplo, LPS y ADN de CpG) para hacer madurar las CD y subsiguientemente inducir inmunidad mediada por células [113-115]. Las señales de peligro se identifican como biomoléculas que conducen a la regulación al alza del gen NF- κ B, que a su vez conduce a la maduración de las CPA y a la liberación de citoquinas inflamatorias. En tal caso, se podrían unir citoquinas de señal de peligro tales como el ligando CD40, GM-CSF o un activador del receptor tipo Toll a una nanopartícula (por ejemplo, en el núcleo o la capa superficial o la capa de polímero hidrófilo), por ejemplo, siguiendo los protocolos descritos previamente para la conjugación de proteínas o péptidos [109-111]. Además, una nanopartícula se puede sintetizar con un antígeno y/o una señal de peligro no complementaria unida a su superficie.

55 Inmunoterapia para la producción de anticuerpos

Algunas formas de realización están dirigidas a la introducción de un antígeno a un paciente para generar anticuerpos en el paciente contra el antígeno. Por ejemplo, las vacunas o los tratamientos antitumorales se pueden llevar a cabo de esta forma. Alternativamente, dichos enfoques pueden usarse para generar anticuerpos para su uso como reactivos científicos, por ejemplo, en animales.

Por lo tanto, se puede introducir una combinación de nanopartícula y antígeno en el paciente. Después de un tiempo predeterminado (por ejemplo, 1-30 días), se toma una muestra del paciente y se miden los anticuerpos contra el antígeno. Se pueden tomar muestras y mediciones adicionales periódicamente. Si los títulos de anticuerpos son demasiado bajos, las nanopartículas y los antígenos se pueden reintroducir y se pueden realizar mediciones adicionales, repitiendo el proceso cuando sea necesario para llevar los títulos de anticuerpos a un nivel deseado. La combinación se puede administrar varias veces.

Discusión de resultados experimentales

5 El suministro de nanopartículas biodegradables a células presentadoras de antígenos (CPA), específicamente
 10 células dendríticas (CD), se documenta en el presente documento, incluidas aplicaciones para inmunoterapia. Los
 ejemplos detallados en el presente documento describen el suministro de nanopartículas de poli(sulfuro de
 15 propileno) (PPS) estabilizadas con poli(etilenglicol) de 20, 25, 45 y 100 nm de diámetro a las CD presentes en los
 ganglios linfáticos. Las nanopartículas de los ejemplos detallados comprenden un núcleo gomoso reticulado de PPS
 rodeado por una corona hidrófila de poli(etilenglicol). El dominio de PPS es capaz de transportar fármacos
 20 hidrófobos y se degrada en polímeros solubles en entornos oxidativos. Pueden unirse a la superficie de la
 nanopartícula antígenos peptídicos o proteicos, que incluyen antígenos glicopeptídicos (definidos en el presente
 documento como polipéptidos glicosilados), y antígenos que codifican ácidos nucleicos. Las partículas de 20 nm se
 captaron más fácilmente por los vasos linfáticos después de la inyección intersticial, mientras que las partículas de
 20 y 45 nm presentaron una retención significativa en los ganglios linfáticos, mostrando una presencia constante e
 intensa a las 24, 72, 96 y 120 h después de la inyección. Las nanopartículas se internalizaron por parte de hasta un
 40-50% de las CD (y las CPA) de los ganglios linfáticos sin el uso de un ligando de direccionamiento exógeno, y el
 sitio de la internalización se encontraba en los ganglios linfáticos más que en el sitio de la inyección. Se observó un
 aumento de las CD (y otras CPA) que contenían nanopartículas a las 96 h con respecto a las 24 h, lo que mostraba
 una infiltración de estas células en los ganglios linfáticos. Se encontró que tanto el tamaño de las nanopartículas
 como la química de superficie influyen en la maduración de CD después de la inyección *in vivo*.

Se encontró que las nanopartículas básicas de PPS tal como se sintetizaron, es decir, núcleos de nanopartículas de
 PPS estabilizados con PLURONIC (un copolímero de bloque de polietilenglicol (PEG) con polipropilenglicol), activan
 25 las CD después de la inyección *in vivo* de las nanopartículas, tal como se indica mediante la expresión aumentada
 de los marcadores de maduración CD86, CD80 y CD40, cuando las nanopartículas eran muy pequeñas; las
 nanopartículas de 25 nm activaron las CD ampliamente después de la inyección *in vivo*, mientras que las
 nanopartículas de 100 nm no lo hicieron. Cuando se utilizó una segunda química de superficie de las nanopartículas,
 es decir, núcleos de nanopartículas de PPS estabilizados con un PLURONIC terminado en metoxi, incluso las
 nanopartículas muy pequeñas no activaron las CD después de la inyección *in vivo*. Se demostró que las
 30 nanopartículas estabilizadas con PLURONIC activan eficazmente el complemento, mientras que las nanopartículas
 estabilizadas con PLURONIC terminado en metoxi no fueron eficaces en la activación del complemento. Por lo tanto,
 la activación del complemento por nanopartículas indujo la activación de las CD después de la exposición a estas
 nanopartículas.

Se encontró que tanto el tamaño de las nanopartículas como la química de superficie influyen en la inmunidad
 adaptativa después de la inyección *in vivo*. El antígeno se conjugó con superficies de nanopartículas estabilizadas
 con PLURONIC y se encontró que inducía fuertemente la formación de anticuerpos solo cuando las nanopartículas
 eran muy pequeñas; las nanopartículas de 25 nm indujeron la formación de anticuerpos mucho más intensamente
 que las nanopartículas de 100 nm. Cuando se utilizó una segunda química de superficie de nanopartículas, es decir,
 40 núcleos de nanopartículas de PPS estabilizados con un PLURONIC terminado en metoxi, incluso las nanopartículas
 muy pequeñas no indujeron una fuerte formación de anticuerpos después de la inyección *in vivo*. Además, cuando
 se inyectaron nanopartículas estabilizadas con PLURONIC de 25 nm a ratones en los que se había desactivado la
 proteína 3 del complemento (ratones C3^{-/-}), estas nanopartículas no indujeron fuertemente la formación de
 anticuerpos. Por lo tanto, los ejemplos detallados muestran que las nanopartículas de tamaño adecuado, por
 45 ejemplo, de 20-45 nm, tienen potencial para aplicaciones inmunoterapéuticas; por ejemplo, se pueden usar para
 dirigirse específicamente y activar las CD de los ganglios linfáticos. Además, cuando estas nanopartículas poseen
 una química de superficie que activa el complemento, tal como se obtiene mediante la estabilización con
 PLURONIC, tienen un gran potencial para funcionar como vehículos de antígeno y como adyuvantes que inducen
 50 inmunidad adaptativa. La combinación especial de tamaño pequeño (por ejemplo, 20-45 nm) y la activación del
 complemento es valiosa en formulaciones de vacunas como adyuvantes.

Por lo tanto, los ejemplos muestran que las nanopartículas se pueden usar para la administración dirigida de
 antígenos y de fármacos a CPA, específicamente CD, de los ganglios linfáticos. La simplicidad de este enfoque es
 que controlando el tamaño, las nanopartículas se pueden captar eficazmente por los vasos linfáticos y retenerse en
 55 los ganglios linfáticos (tal como se muestra, durante al menos 5 días), y sin utilizar ningún ligando de
 direccionamiento exógeno específico; se internalizan eficazmente por las CD residentes nodales y otras CPA (por
 ejemplo, macrófagos). Las nanopartículas con un tamaño de hasta aproximadamente 45 nm o de hasta
 aproximadamente 100 nm no pueden dirigirse eficazmente a los vasos linfáticos y los ganglios linfáticos por este
 medio. Además, se demuestra que hasta aproximadamente el 40 a aproximadamente el 50% de las CD de los
 60 ganglios linfáticos residentes internalizan nanopartículas, lo que demuestra aún más la eficacia de este vehículo de
 administración. También se demostró que después de la exposición a nanopartículas de dichos intervalos de tamaño
 que se dirigen de forma eficaz a los vasos linfáticos, cuando esas nanopartículas activan el complemento, las CD
 responden volviéndose más maduras e induciendo inmunidad adaptativa dependiente de células T. Esta es una
 65 clara demostración de la potencia de usar la cascada del complemento como una señal de peligro en las
 formulaciones de adyuvantes de presentación de antígenos. Se ha demostrado que la combinación de tamaño
 pequeño (para ingresar efectivamente en los linfáticos después de la administración) y la activación del

complemento (para estimular CPA, incluida la maduración de CD), podría inducir fuertes respuestas inmunitarias adaptativas, tanto humorales dependientes de células T (por medio de títulos de Ab) como celulares (por medio de las mediciones de la memoria de las células T a través de la proliferación de células T y mediciones ELISPOT). Esta combinación especial de tamaño pequeño y activación del complemento es muy valiosa en inmunoterapia.

El ejemplo 1 describe técnicas de polimerización en emulsión para producir nanopartículas. Estas técnicas se pueden aplicar a una diversidad de monómeros/polímeros para producir partículas adecuadas. El ejemplo 2 se relaciona con la modificación de PLURONIC y se puede aplicar en general a la modificación de otros polímeros del presente documento, con variaciones que se realizan para considerar estructuras químicas particulares.

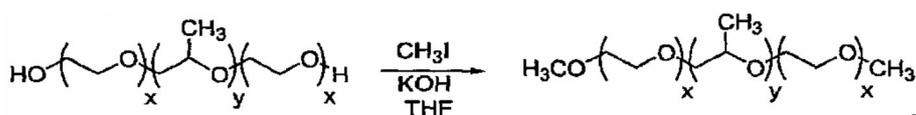
EJEMPLOS

Ejemplo 1: Nanopartículas

Se sintetizaron nanopartículas de PPS con diámetros de 20, 45 y 100 nm mediante polimerización en emulsión inversa tal como se describe en otra parte; en la expresión "polimerización en emulsión" utilizada en el presente documento incluimos polimerización en emulsión inversa, y en el término "emulsión", incluimos emulsión inversa [39]. En resumen, se creó una emulsión añadiendo el emulsionante de copolímero de bloque PEG, PLURONIC F-127 (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza) y el monómero sulfuro de propileno a agua milliQ ultrapura con agitación constante. El tetraioéster de pentaeritritol iniciador protegido se sintetizó tal como se describe en otra parte [39] y, en un matraz separado, se desprotegió mezclándolo con 0,20 ml de una solución de metilato sódico 0,5 M con agitación durante 10 minutos. A continuación, después de la desprotección, el iniciador se añadió a la emulsión de monómero y, 5 minutos más tarde, se añadieron a la reacción 60 μ l de la base diaza[5.4.0] biciclicoundec-7-eno (DBU) y se dejó con agitación continua durante 24 h en atmósfera inerte. Las nanopartículas se expusieron después al aire para producir una reticulación de disulfuro.

Las nanopartículas se purificaron de monómeros restantes, base o PLURONIC libre mediante 2 días de diálisis repetida con una membrana de MWCO de 12-14 kDa (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA) frente al agua ultrapura milliQ. Las distribuciones del tamaño de las nanopartículas se determinaron utilizando un instrumento de dispersión de la luz dinámica (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). El marcado fluorescente se realizó añadiendo 6-yodoacetamido-fluoresceína o Alexa Fluor 488 maleimida (Molecular Probes, Eugene, OR) a 1 mg/ml de solución de nanopartículas a los tioles reactivos que permanecen en las nanopartículas, y luego se agitó en la oscuridad durante 6 h. Las nanopartículas se expusieron después al aire para la posterior reticulación de disulfuro. La yodoacetamido-fluoresceína o la maleimida Alexa Fluor libre se eliminó mediante diálisis repetida durante 1 día utilizando una membrana de corte de PM de 25 kDa (Spectrum Laboratories) contra PBS 5 mM.

Ejemplo 2: Síntesis de PLURONIC terminado en metoxi



Esquema I

Se utilizaron Pluronic F127 (Sigma), yoduro de metilo (Fluka), hidróxido de potasio (Fluka), tiosulfato de sodio pentahidratado (Riedel de Haen), sulfato de sodio anhidro (Applichem), cloruro de sodio (Sigma), dietiléter (Fisher) y diclorometano (Fisher) tal como se recibieron. Se secó tetrahidrofurano estabilizado con BHT al 0,025% (Acros) a través de tamices moleculares antes de su uso. La reacción se llevó a cabo en atmósfera de argón (Messer). Para la diálisis se usó un tubo de celulosa regenerada (Spectrapor) con un corte de peso molecular de 3400. Se midió la RMN de ^1H en dimetilsulfóxido deuterado (Armar) y los desplazamientos químicos (δ) se proporcionan en ppm con respecto a la señal del disolvente residual a 2,5 ppm.

A una solución de 10,0 g (0,79 mmol) de PLURONIC F127 en 100 ml de THF, se añadieron 2,99 g (53,3 mmol) de hidróxido de potasio finamente molido y 988 μ l (15,9 mmol) de yoduro de metilo y la mezcla se agitó en la oscuridad durante 19 h. La solución transparente se decanta y se añaden 3,94 g de tiosulfato sódico pentahidratado, 100 ml de solución acuosa saturada de cloruro de sodio y 100 ml de diclorometano. La mezcla se agitó vigorosamente y se transfirió a un embudo de separación. Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 100 ml). Las fracciones orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a presión reducida. El sólido se disolvió en una cantidad mínima de agua bidestilada y se dializó contra 4500 ml de agua durante un día. La solución acuosa transparente se satura con cloruro de sodio y se extrae con diclorometano (3 x 100 ml) y se seca sobre sulfato de sodio. Después de la eliminación del disolvente, el residuo se extrae en un extractor Soxhlet con dietiléter durante 6 h para obtener un rendimiento después del secado a presión reducida de

9,25 g de un sólido blanco. La RMN mostró la ausencia del grupo OH a 4,6 ppm y la presencia del grupo OCH₃ a 3,2 ppm. $\delta = 1,1$ (d, CH₃, PPG), 3,2 (s, OCH₃), 3,3 (m, CH, PPG), 3,4 (m, CH₂, PPG), 3,5 (m, PEG).

Ejemplo 3: Animales

A menos que se indique lo contrario, para este estudio se utilizaron ratones BALB/c, de 6 a 9 semanas de edad y con un peso de 20-30 g. Todos los protocolos fueron aprobados por las autoridades veterinarias del cantón de Vaud según la legislación suiza. La anestesia se administró mediante inyección subcutánea de clorhidrato de ketamina a 10 mg/kg y xilazina a 1 mg/kg. Los ratones se sacrificaron por medio de asfixia con CO₂.

Ejemplo 4: Microlinfangiografía

Para determinar las características de captación relativas de las nanopartículas después de una inyección intersticial en la piel, se realizó una microlinfangiografía de fluorescencia mediante inyección a presión constante en la punta de la cola tal como se ha descrito anteriormente [43-45]. Se depiló la cola del ratón y el ratón se dispuso en la pletina del microscopio (Axiovert 200M, Zeiss) con una almohadilla térmica para mantener una temperatura corporal de 37 °C. Se introdujo una solución de 20 mg/ml de nanopartículas de PPS fluorescentes (20, 45 o 100 nm de diámetro) en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) en un catéter; una aguja de calibre 30 unida al catéter se insertó por vía intradérmica a ~1 mm desde la punta de la cola y se abrió una llave de paso que inició el flujo a una presión constante de 40 mmHg. La velocidad de flujo de la solución de nanopartículas (supervisada mediante una burbuja que se encuentra corriente arriba en el entubado) promedió 0,1 μ l/min en aproximadamente 20 mm³ de tejido (estimados a partir del volumen visible desde el depósito de inyección), o aproximadamente 5 μ l/g/min. No se observó hinchazón visible. Las imágenes secuenciales a lo largo de la longitud de la cola se registraron en un tiempo de exposición constante; se repitieron 3 experimentos para cada tamaño de nanopartículas.

Se utilizó una microlinfangiografía de fluorescencia en la cola del ratón para evaluar la captación por los vasos linfáticos de nanopartículas de PPS de 20, 45 y 100 nm de diámetro. Después de la infusión con partículas de 20 nm, la red capilar linfática hexagonal fue claramente visible después de 90 minutos y se llenó uniformemente desde el sitio de la inyección (figura 1a). Por el contrario, solo se observó una red linfática muy débil después de la inyección con las partículas de 45 nm (figura 1b), y se pudo observar muy poca red con las partículas de 100 nm (figura 1c), lo que indica una captación deficiente. Se sabe que el límite superior de tamaño para la fuga de macromoléculas/proteínas/partículas a los capilares sanguíneos es de ~3,5 nm [42], por lo tanto, la fuga en la vasculatura sanguínea de nuestras partículas más pequeñas de 20 nm es, en la práctica, de cero. Por lo tanto, este procedimiento confirma cualitativamente que las partículas de 20 nm se incorporan más fácilmente a los capilares linfáticos desde el espacio intersticial en comparación con las partículas de 45 nm y 100 nm.

Ejemplo 5: Evaluación de la distribución de nanopartículas en los ganglios linfáticos: retención en los ganglios linfáticos de nanopartículas pequeñas (por ejemplo, 20-45 nm)

Para evaluar la retención por los ganglios linfáticos, se inyectaron 20 μ l de 20 mg/ml de nanopartículas de PPS fluorescentes (20, 45 y 100 nm de diámetro) en embolada en la punta de la cola del ratón o la almohadilla de una pata delantera a través de una aguja de calibre 30; los controles se realizaron con inyecciones de 20 μ l de PBS. No se observó inflamación en los sitios de inyección. A las 24, 72, 96 o 120 h, los ratones se sacrificaron mediante asfixia con CO₂. Los ganglios linfáticos sacros y lumbares, que drenan los vasos linfáticos de la cola y las piernas, los ganglios linfáticos braquiales y axilares, que drenan los vasos linfáticos de la zona de la almohadilla de la pata delantera, se extrajeron, se congelaron instantáneamente, se criosectionaron en secciones de 10 μ m y se inmunotifieron con anticuerpos contra CD3e de ratón (PharMingen, San Diego, CA), CD45R (Caltag, Burlingame, CA), CD68 (Serotec, Dusseldorf, Alemania), Dec-205 (Serotec) y CD31 (PharMingen) para marcar células T, células B, macrófagos/CD, CD y células endoteliales, respectivamente. La detección secundaria se realizó con los anticuerpos Alexa Flour 594 nm (Molecular Probes). Se tomaron imágenes de las secciones de ganglios linfáticos con fluorescencia (Axiovert 200M, Zeiss) y microscopía de barrido láser confocal (LSM 510 Meta, Zeiss).

El tiempo de retención en los ganglios linfáticos de nanopartículas y liposomas se ha investigado por otros investigadores con el propósito de estudiar el sistema linfático y, normalmente, se ha enfocado en puntos temporales en el intervalo de 6-52 h después de la inyección [31-34, 36]. Los ejemplos expuestos en el presente documento describen la retención en ganglios linfáticos de nanopartículas de hasta 120 h, y mostraron que las partículas de 20 nm estaban significativamente presentes en niveles cualitativamente constantes en el ganglio linfático a las 24, 72, 96 y 120 h después de una inyección en embolada de 20 μ l por vía intradérmica (figura 2). Las nanopartículas de 45 nm también estaban presentes, aunque en cantidades más bajas, en los ganglios linfáticos en todos los puntos temporales, mientras que las nanopartículas de 100 nm no estaban presentes de forma visible en los ganglios linfáticos en ningún punto temporal (figura 2). Por lo tanto, junto con los resultados de la figura 1, estos datos muestran que 20-45 nm es un buen intervalo de tamaño de nanopartículas de PPS tanto para la captación por vasos linfáticos como para la retención en ganglios linfáticos, siendo 20 nm óptimo, mientras que las partículas de 100 nm son demasiado grandes para una captación por los vasos linfáticos eficaz desde el intersticio después de una inyección a presión constante. Esto es coherente con estudios previos que han demostrado que los liposomas > 70 nm permanecen principalmente en el sitio de la inyección [24, 30].

Se evaluaron ubicaciones específicas, con respecto a las diversas células inmunitarias, en las que se acumulaban nanopartículas de PPS dentro de los ganglios linfáticos. Los resultados de la tinción fueron coherentes con la arquitectura conocida de los ganglios linfáticos, en la que se pueden ver fácilmente zonas específicas para linfocitos T y B [2]. Las células T tienden a agregarse en las regiones centrales del ganglio, mientras que las células B a menudo se encuentran en centros germinales ubicados hacia la membrana externa. Los otros tipos de células principales presentes en los ganglios linfáticos son CPA o células MHCII⁺, a saber, CD y algunos macrófagos, y su ubicación es a menudo más dispersa. La figura 3 muestra secciones en serie del mismo ganglio linfático después de una inyección intradérmica de partículas de 20 nm. Las nanopartículas no estaban presentes en las regiones de células T o células B (figuras 3a, b). No obstante, hubo una colocalización significativa de las nanopartículas con macrófagos y CD; es decir, células CD68⁺ (figura 3c).

Generalmente se ha asumido que los liposomas y las nanopartículas suministradas a los ganglios linfáticos son principalmente fagocitados por macrófagos en los mismos [21, 27, 29, 30, 32, 36, 37]. Sin embargo, no se ha apreciado en estas técnicas que también estén presentes en los ganglios linfáticos CD inmaduras capaces de absorber antígenos [15, 16]. Con el suministro de nanopartículas de PPS, la inmunotinción para CD68 (que, aunque es una proteína transmembrana, también se expresa intracelularmente [47-50]) verificó que los macrófagos y las CD habían internalizado nanopartículas de PPS (figura 4a). Para determinar adicionalmente si las células CD68⁺ eran macrófagos, CD, o ambos, los ganglios linfáticos se inmunotñeron para el receptor de CD altamente específico Dec-205 [4, 38, 51-56]. Las células Dec-205⁺ y su colocalización con nanopartículas (figura 4b) demuestran que una fracción significativa de las células presentes en el ganglio linfático que fagocitan las nanopartículas eran, de hecho, CD. Esto será ventajoso para administrar antígenos a los ganglios linfáticos con el fin de estimular las CPA, incluidas las CD de tipo CPA más potentes.

Ejemplo 6: Aislamiento y tinción de células de ganglios linfáticos

Las células de los ganglios linfáticos se aislaron siguiendo un protocolo descrito previamente [46]. En resumen, después de las inyecciones de nanopartículas fluorescentes o PBS tal como se ha descrito anteriormente, los ganglios linfáticos se extrajeron, se trataron con agujas de calibre 26 y se digirieron en colagenasa D (Roche, Basilea, Suiza) durante 25 minutos a 37 °C. El tejido se hizo pasar después a través de un filtro de células de 70 µm (BD, Basilea, Suiza) para recuperar una suspensión celular. Con la suspensión celular de los ganglios linfáticos, las CPA se tiñeron con R-PE anti-MHC de clase II (I-A) (Chemicon, Temecula, CA) y las CD con alofococianina anti-CD11c (Pharmingen). La maduración de las CD se midió mediante tinción con R-PE anti-CD86 y R-PE anti-CD80 (Pharmingen).

Ejemplo 7: Internalización de nanopartículas in vitro

Después del aislamiento de las células de los ganglios linfáticos, las células se plaquearon en RPMI (FBS al 5%) a ~500.000 células/ml. Las células se pulsaron con 20 µl de 20 mg/ml de nanopartículas fluorescentes y se incubaron durante 24 h. Las células se lavaron después dos veces con HBSS y se tiñeron para CPA y CD tal como se ha mencionado anteriormente.

Ejemplo 8: Citometría de flujo y análisis e internalización de nanopartículas in vitro: absorción por CPA, incluidas CD

Después de la tinción, las suspensiones de células de los ganglios linfáticos se analizaron mediante citometría de flujo (CyAn ADP, Dako, Glostrup, Dinamarca). Se realizó un análisis adicional utilizando el programa informático FlowJo (TreeStar, Ashland, OR). Se determinó que las CPA y las CD que habían internalizado nanopartículas fluorescentes eran MHCII⁺FITC⁺ y CD11c⁺FITC⁺, respectivamente, representando FITC el marcado de las nanopartículas. La maduración de CD después de la internalización de nanopartículas se evaluó calculando la fracción de células que expresaban CD86 y CD80.

Se realizó un análisis de citometría de flujo para cuantificar la fracción de CPA y CD de los ganglios linfáticos que internalizaban nanopartículas. La figura 5a muestra que hasta un ~40% de las CPA (MHCII⁺) y específicamente el ~50% de las CD (CD11c⁺) de los ganglios linfáticos han absorbido nanopartículas de 20 nm después de 24 h después de la inyección. En consecuencia, y en general, se contemplan aplicaciones de nanopartículas con al menos del 10% a aproximadamente el 95% de absorción por CPA y/o CD; los expertos apreciarán de inmediato que se contemplan todos los intervalos y valores dentro de los intervalos indicados explícitamente, por ejemplo, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 40%, o entre aproximadamente el 25% y aproximadamente el 75%/50%. También una fracción significativa de las CPA y las CD fagocitan nanopartículas de 45 nm, mientras que se observó muy poca absorción de las nanopartículas de 100 nm después de la inyección *in vivo*. Las CPA, incluidas las CD, podrían haber endocitado las partículas después de llegar a los ganglios linfáticos, o se podrían haber internalizado en el lugar de la inyección antes de que se transportaran a los ganglios linfáticos. Si este último fuera el caso, se verían partículas de 100 nm en el ganglio linfático, ya que las CPA pueden endocitar las partículas más grandes (1-10 µm) con la misma eficacia que las más pequeñas [13, 57]. Se verificó que el tamaño de las nanopartículas no afectó a la internalización de CPA o CD mediante experimentos *in vitro*; casi todas las CPA y CD

internalizaron nanopartículas independientemente de su tamaño (figura 5b). Por lo tanto, es probable que las nanopartículas de PPS sean absorbidas pasivamente en los vasos linfáticos periféricos y alcancen los ganglios linfáticos, donde son fagocitadas por CD o CPA residentes. Estos resultados refuerzan los hallazgos recientes de que en los ganglios linfáticos hay presencia de cantidades sustanciales de CD inmaduras capaces de internalizar antígenos [15, 16]. De hecho, las CD y otras CPA presentes en los ganglios linfáticos ofrecen una diana valiosa para iniciar la inmunidad mediada por células a través de vehículos de administración de fármacos.

Se investigó una comparación de la internalización de las nanopartículas en diferentes momentos. Se encontró que la colocalización de nanopartículas con macrófagos y CD fue visiblemente mayor a las 96 h que a las 24 h (figura 6a). Se utilizó un análisis de citometría de flujo para determinar si hubo un cambio en el tipo de macrófagos y en las CD que internalizan nanopartículas a las 96 h con respecto a las 24 h. De todas las células que habían internalizado nanopartículas a las 24 h, ~15% eran CPA (MHCII⁺) y ~13% fueron CD (CD11c⁺), lo que sugiere que la mayor parte de las CPA eran CD y que el ~85% restante de las células que contienen nanopartículas eran macrófagos que no presentaban antígenos (MHCII⁻). A las 96 h, la fracción de células con nanopartículas que eran CPA o CD fue del 61 ± 5% y del 33 ± 3%, respectivamente (nótese que esto no refleja un aumento en la fracción de CPA y CD de los ganglios linfáticos que contienen nanopartículas, que permanece constante en los niveles mostrados en la figura 5a). El aumento de células MHCII⁺ y CD11c⁺ que contienen nanopartículas puede deberse a una infiltración de CPA y CD en los ganglios linfáticos que después recogen nanopartículas libres que aún permanecen en el tejido nodal. También es posible que el aumento de células MHCII⁺ con nanopartículas se deba a la activación de macrófagos entre las 24-96 h (es decir, macrófagos MHCII⁻ que se activan y son por lo tanto MHCII⁺ después de la internalización de nanopartículas).

Una fracción significativa de las CD de los ganglios linfáticos ya están maduras; sin embargo, dado que hay presencia de CD inmaduras, es probable que estas células maduren después de la absorción del antígeno. Por lo tanto, se determinó si las nanopartículas de PPS activadoras del complemento estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, hidroxiladas) de 20 nm ayudan a inducir la maduración de CD, de tal forma que no sean necesarias "señales de peligro" biológicas exógenas convencionales cuando se usan en combinación con las nanopartículas de PPS activadoras del complemento estabilizadas con PLURONIC. Después de las inyecciones de nanopartículas activadoras del complemento estabilizadas con PLURONIC de 20 nm, la expresión del marcador de maduración de CD CD86 aumentó en comparación con los controles que recibieron inyecciones de PBS (figura 7). La expresión de CD de CD80 también se midió y se determinó que era significativamente mayor después de la internalización de las nanopartículas (figura 7b). Finalmente, se encontró que los niveles de expresión de CD86 y CD80 en las CD con nanopartículas no cambiaron a las 96 h con respecto a las 24 h después de la inyección. Esto sugiere que las nanopartículas activadoras del complemento estabilizadas con PLURONIC de 20 nm ofrecen un estímulo de maduración prolongada, que podría ser útil para mantener la activación de células T y la inmunidad mediada por células a lo largo de un período de tiempo prolongado. Por lo tanto, estos resultados muestran que las nanopartículas PPS activadoras del complemento estabilizadas con PLURONIC pueden cumplir una doble función, actuando como vehículo para la administración de antígeno específico a las CD y también como adyuvante que madura y activa las CD de los ganglios linfáticos.

Ejemplo 9: Detección de C3a en suero humano

Se recubrieron placas de 96 pocillos (Becton Dickinson) con anticuerpo monoclonal antihumano de ratón C3a/C3a (desArg) (AntibodyShop, Grusbakken, Dinamarca) a una dilución de 1:4000 en PBS a 100 µl/pocillo. Las placas se dejaron toda la noche a temperatura ambiente (TA). El anticuerpo no unido se retiró mediante una sacudida (es decir, se retiró mediante un movimiento mecánico repentino) y la placa se lavó 3x con 200 µl/pocillo de agua DI. Las placas se bloquearon durante 1,5 h a TA con 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo (PBS + Tween20 al 0,05% + albúmina de suero bovino al 0,5%).

El suero humano se incubó a un volumen de 1:1 con PBS, suspensiones de nanopartículas estabilizadas con PLURONIC (y por lo tanto, nanopartículas hidroxiladas) y suspensiones de nanopartículas estabilizadas con nanopartículas terminadas en metoxi (y, por lo tanto, nanopartículas no hidroxiladas) en tubos Eppendorf a 37 °C durante 45 min. Cuando las placas terminaron de bloquearse, se lavaron 3x con 250 µl/pocillo de tampón de lavado (PBS + Tween20 al 0,05%). Después se añadieron muestras de nanopartículas en suero a los pocillos por triplicado a 50 µl/pocillo durante 2 horas a TA. Las muestras, después, se retiraron mediante una sacudida y la placa se lavó con tampón de lavado 5x a 250 µl/pocillo. Después se añadió anticuerpo de detección biotinilado C3a/C3a (desArg) (AntibodyShop) a una dilución 1:4000 en un tampón de bloqueo a 50 µl/pocillo durante 2 horas a TA. Después se retiró el anticuerpo de detección C3a y la placa se lavó con tampón de lavado 5x a 250 µl/pocillo. A continuación se diluyó estreptavidina-anticuerpo HRP (R&D systems) en tampón de bloqueo a la concentración recomendada por el fabricante y se añadió a la placa a 50 µl/pocillo durante 2 horas a TA. A continuación se retiró mediante una sacudida el anticuerpo HRP y la placa se lavó con tampón de lavado 5x a 250 µl/pocillo. A continuación, se añadió reactivo de sustrato HRP (R&D systems) a 100 µl/pocillo en la oscuridad durante 45 minutos a TA. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2 N. Después se leyó la placa en un lector de placas Tecan a 450 nm y 540 nm de longitud de onda. Los valores de fondo de 540 nm se restaron de 450 nm para obtener los valores finales.

El C3a presente en el suero incubado con PBS se comparó con el C3a presente después de la incubación con nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, nanopartículas hidroxiladas) y con nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC terminado en metoxi (y, por lo tanto, nanopartículas no hidroxiladas). La incubación con las nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC terminado en metoxi condujo a un aumento de ~7 veces, y la incubación con las nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC condujo a un aumento de ~32 veces de C3a presente en suero con PBS, tal como se muestra en la figura 8. Las nanopartículas hidroxiladas, por lo tanto, activaron el sistema del complemento mucho más que las nanopartículas no hidroxiladas, según se midió mediante la escisión del C3 en suero humano dando C3a soluble y C3b unido. Esto confirma que la superficie de OH de la nanopartícula activa la ruta alternativa del sistema del complemento de forma mucho más eficaz que una superficie de metoxi.

Ejemplo 10: Efectos de la química de superficie sobre la maduración de CD

Se inyectaron por vía intradérmica a ratones nanopartículas estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, nanopartículas hidroxiladas; producidas tal como se describe en el presente documento) de 25 nm, nanopartículas estabilizadas con nanopartículas de PLURONIC terminado en metoxi (y, por lo tanto, no hidroxiladas) de 25 nm, nanoesferas de poliestireno carboxilado (COOH-NS) de 20 nm (Invitrogen), PBS y LPS (30 µg) tal como se ha descrito anteriormente. Los ganglios linfáticos se extrajeron y las células se aislaron y se tiñeron para CD11c, CD86, CD80 y CD40 tal como se ha descrito anteriormente. Se realizó una citometría de flujo para determinar el perfil de maduración de las CD de los ganglios linfáticos.

Como se observa en la figura 9, los perfiles de CD86, CD80 y CD40 para nanopartículas estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, hidroxiladas) en comparación con nanopartículas estabilizadas con PLURONIC terminado en metoxi (y, por tanto, no hidroxiladas) y con nanoesferas de poliestireno carboxiladas son significativamente diferentes. Las CD de animales tratados con nanopartículas estabilizadas con PLURONIC muestran una mayor expresión de estos marcadores de maduración de CD, además inducen la maduración a niveles similares a los del LPS de control positivo. Las CD de animales tratados con nanopartículas estabilizadas con PLURONIC terminado en metoxi y de animales tratados con nanoesferas de poliestireno carboxilado produjeron respuestas de maduración de CD casi idénticas a las de la inyección de PBS de control negativo. Estos resultados muestran que la respuesta de maduración CD *in vivo* viene dictada específicamente por la química de la superficie de las nanopartículas de 20-25 nm. La superficie hidroxilada induce la maduración de CD mientras que las superficies de metoxi y carboxilo no lo hacen. Basándose en los resultados presentados en este documento, la diferencia funcional en estas superficies se encuentra en la activación del complemento por medio de las superficies hidroxiladas.

Ejemplo 11: Efectos del tamaño sobre la maduración de CD

Se inyectaron por vía intradérmica a ratones nanopartículas estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, hidroxiladas) de 25 nm, nanopartículas estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, hidroxiladas) de 100 nm y PBS tal como se ha descrito anteriormente. A continuación, los ganglios linfáticos se extrajeron y las células se aislaron y se tiñeron para CD11c, CD86, CD80 y CD40 tal como se ha descrito en el presente documento. Se realizó una citometría de flujo para determinar el perfil de maduración de las CD de los ganglios linfáticos.

Como se observa en la figura 10, los perfiles de CD86, CD80 y CD40 para nanopartículas estabilizadas con PLURONIC (y por tanto hidroxiladas) de 25 nm en comparación con las de 100 nm de la misma química de superficie son significativamente diferentes. Las nanopartículas estabilizadas con PLURONIC de 25 nm muestran una mayor expresión de estos marcadores de maduración de CD. Las inyecciones de nanopartículas estabilizadas con PLURONIC de 100 nm produjeron respuestas de maduración de CD casi idénticas a las de la inyección de PBS de control negativo. Estos resultados muestran que la respuesta de maduración CD *in vivo* está específicamente relacionada con el tamaño de las nanopartículas. Se ha descrito en el presente documento que las nanopartículas estabilizadas con PLURONIC de 25 nm penetran de forma eficaz en los capilares linfáticos y se transportan a los ganglios linfáticos en mucha mayor medida que las nanopartículas estabilizadas con PLURONIC de 100 nm. Además, la retención de nanopartículas estabilizadas con PLURONIC de 25 nm y la internalización por CD en los ganglios linfáticos son muy superiores a las de las nanopartículas estabilizadas con PLURONIC de 100 nm. En el presente documento se muestra que también la maduración de CD es muy superior con nanopartículas estabilizadas con PLURONIC de 25 nm en comparación con nanopartículas estabilizadas con PLURONIC de 100 nm. La capacidad de las nanopartículas estabilizadas con PLURONIC ultrapequeñas de 25 nm para inducir la maduración de la CD demuestra que el direccionamiento a los ganglios linfáticos y la química de la superficie son útiles para activar las CD. Basándose en los resultados de la entrada de nanopartículas en los capilares linfáticos presentados en el presente documento, se espera que las nanopartículas estabilizadas con PLURONIC (y, por tanto, hidroxiladas) de 45 nm puedan activar las CD dentro del ganglio linfático.

Ejemplo 12: Conjugación de OVA a nanopartículas

La conjugación de antígenos con nanopartículas de PPS se puede realizar funcionalizando la superficie de Pluronic (un copolímero de bloque de PEG y PPG) con proteínas o péptidos, incluidos glicopéptidos. En este ejemplo se

presenta un esquema de conjugación para un antígeno proteico que contiene un residuo de cisteína libre para la conjugación química. Pueden utilizarse otras funcionalidades en esquemas relacionados, tales como aminas en el extremo N-terminal o en residuos de lisina. El antígeno también puede estar adsorbido en superficies de nanopartículas.

En el presente documento, se muestra el esquema de conjugación para ovoalbúmina (OVA). La OVA es una proteína modelo para investigar la presentación de antígenos por CD que posee los polipéptidos antigénicos OVA₂₅₇₋₂₆₄ y OVA₃₂₃₋₃₃₉ que son procesados por CD a través de las rutas MHCI y II, respectivamente. El esquema de conjugación comienza con la síntesis de la Pluronic-divinilsulfona a la que se acopla OVA a través de un grupo tiol libre en la OVA en una reacción de adición de Michael. Los detalles de síntesis para ambas etapas se proporcionan a continuación.

Se utilizaron Pluronic F127 (Sigma), divinilsulfona (Fluka), hidruro de sodio (Aldrich), tolueno (VWR), ácido acético (Fluka), dietiléter (Fisher), diclorometano (Fisher) y Celite (Macherey Nagel) tal como se recibieron. La reacción se llevó a cabo en atmósfera de argón (Messer). Se midió la RMN de ¹H en cloroformo deuterado (Armar) y los desplazamientos químicos (δ) se proporcionan en ppm con respecto a la señal del patrón interno tetrametilsilano (Armar) a 0,0 ppm.

Una solución de 15 g (1,18 mmol) de Pluronic F-127 en 400 ml de tolueno se secó por destilación azeotrópica durante 4 h usando una trampa de Dean-Stark. La solución se enfrió en un baño de hielo y se añadieron 0,283 g (11,8 mmol) de hidruro de sodio. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos y se añadieron rápidamente 3,55 ml (35,4 mmol) de divinilsulfona (Sigma-Aldrich). Después de agitar en la oscuridad durante 5 días a temperatura ambiente, la reacción se detuvo añadiendo 1,35 ml (23,6 mmol) de ácido acético. Después de filtrar a través de celite y de concentrar el filtrado a presión reducida hasta un volumen pequeño, el producto se precipitó en 1 litro de dietiléter helado. El sólido se retiró por filtración, se disolvió en una cantidad mínima de diclorometano y se precipitó en dietiléter helado cuatro veces en total. El polímero se secó al vacío para producir 6,0 g y se almacenó en atmósfera de argón a -20 °C antes de la conjugación con OVA. La RMN mostró la presencia de vinilsulfona y el grado de funcionalización fue del 88%. δ = 1,1 (m, CH₃, PPG), 3,4 (m, CH, PPG), 3,5 (m, CH₂, PPG), 3,6 (PEG), 6,1 (d, CH_{cis}=CH-SO₂) y 6,4 (d, CH_{trans}=CH-SO₂), 6,85 (dd, CH₂=CHSO₂-).

Antes de la conjugación, la PLURONIC-vinilsulfona se dializó contra agua utilizando un tubo de diálisis de celulosa regenerada con un corte de peso molecular de 6-8 kDa durante días. El material se recuperó mediante liofilización y se mide la RMN para confirmar que esta etapa no influye en el número de grupos vinilsulfona. La conjugación de OVA se realiza añadiendo 300 mg (0,023 mmol) de PLURONIC-vinilsulfona a una solución de 50 mg (0,0011 mmol) de OVA en un tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH = 8,1). Después de reaccionar durante 6 horas a 4 °C, la mezcla de reacción se liofilizó. Se añade diclorometano y la mezcla turbia se centrifuga a 12000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El diclorometano, que contiene PLURONIC-vinilsulfona sin reaccionar, se elimina y el precipitado se seca a presión reducida para eliminar el diclorometano residual. La PL-VS-OVA se almacenó después a -20 °C hasta que se usó para la síntesis de nanopartículas.

Las partículas se sintetizaron tal como se describe en el presente documento con la diferencia de que el 2% en peso de Pluronic se reemplazó por PL-VS-OVA. Se utilizó una cantidad total del 1,5% de PLURONIC con respecto al PPS (peso/volumen). Con el fin de reducir la exposición de la proteína o los péptidos a las condiciones básicas durante la síntesis de las nanopartículas, el tiempo de reacción se redujo a 6 h y la base se añadió a una relación molar de 1:1 con respecto a tioles iniciadores.

Además, la PL-VS-OVA puede marcarse de forma fluorescente con rodamina-yodoacetamida haciendo reaccionar los tioles libres remanentes en la OVA. Las nanopartículas se pueden sintetizar y marcar con fluoresceína-yodoacetamida para producir nanopartículas conjugadas con OVA doblemente marcadas, marcándose OVA con rodamina y nanopartículas con fluoresceína.

Las nanopartículas conjugadas con OVA doblemente marcadas se inyectaron por vía intradérmica en ratones tal como se describe en el presente documento. Después se extrajeron los ganglios linfáticos a las 24 y 48 h después de la inyección, a continuación se congelaron y se crioseccionaron. Las secciones de los ganglios linfáticos se observaron por medio de microscopía de fluorescencia.

Se realizó una dispersión dinámica de la luz sobre nanopartículas estabilizadas con PLURONIC conjugadas con OVA y se demostró que el tamaño se mantenía a ~25 nm. Las nanopartículas estabilizadas con PLURONIC conjugadas con OVA doblemente marcadas estaban presentes en los ganglios linfáticos a las 24 y 48 h después de la inyección, tal como se demuestra en la figura 11. La OVA estaba presente en las mismas ubicaciones que las nanopartículas. Estos resultados demuestran que la funcionalización de las nanopartículas con un antígeno proteico OVA de ~43 kDa de PM no afecta significativamente al tamaño de las nanopartículas. La capacidad de producir nanopartículas conjugadas con OVA de 25 nm permite que el antígeno proteico se administre a través de los vasos linfáticos a las CD de los ganglios linfáticos. Este suministro de antígeno a las CD de los ganglios linfáticos residentes ofrece la posibilidad de mejorar la respuesta inmunitaria adaptativa subsiguiente. La OVA se presenta a este respecto simplemente como un antígeno modelo ejemplar. Se puede utilizar de forma análoga cualquier

cantidad de antígenos moleculares, incluidos péptidos, proteínas, incluidos glucopéptidos, y ácidos nucleicos que codifican antígenos proteicos.

Ejemplo 13: Maduración de CD inducida por OVA conjugada a nanopartículas estabilizadas con PLURONIC

Se inyectaron por vía intradérmica en ratones tal como se describe en el presente documento nanopartículas estabilizadas con PLURONIC conjugadas con OVA de 25 nm y OVA mezclada con lipopolisacárido (LPS). Después se recogieron los ganglios linfáticos y las células se aislaron y se tiñeron para CD11c, CD86, CD80 y CD40 tal como se describe en el presente documento. Se realizó una citometría de flujo para determinar el perfil de maduración de las CD de los ganglios linfáticos.

Tal como se muestra en la figura 12, los perfiles de CD86, CD80 y CD40 para nanopartículas estabilizadas con PLURONIC conjugadas con OVA de 25 nm en comparación con el control positivo OVA con LPS son casi iguales. Ambos muestran una expresión elevada de estos marcadores de maduración de CD. Estos resultados muestran que la respuesta de maduración de CD *in vivo* es casi la misma para OVA administrado mediante nanopartículas de 25 nm estabilizadas con PLURONIC y para OVA inyectado conjuntamente con la señal de peligro molecular LPS. Esto sugiere la posibilidad de usar OVA conjugada a nanopartículas pequeñas, por ejemplo de 20-45 nm, que estén hidroxiladas y que activen el complemento, por ejemplo, formadas mediante la estabilización con PLURONIC de nanopartículas de PPS, como vehículos de administración de antígeno y adyuvantes de estímulo de maduración.

Ejemplo 14: Proliferación de células T

Se usó un procedimiento conocido como transferencia adoptiva de células T para medir la proliferación de células T. Los ratones OT-II Tg (Jackson Immunoresearch) son transgénicos en el sentido en que tienen un nivel regulado al alza del receptor de células T OVA en células T CD4. Se aislaron el bazo y los ganglios linfáticos de ratones OT-II Tg para producir suspensiones celulares. Para las suspensiones de células del bazo, los glóbulos rojos se lisaron con el 1,667% de NH_4Cl . Se agruparon las células del bazo y los ganglios linfáticos y se realizó un recuento: un total de 400×10^6 células recuperadas.

Las células se marcaron con éster succinimidílico de carboxifluorocéina (CFSE) y se resuspendieron a $20 \times 10^6/\text{ml}$ en RPMI sin FBS. La solución madre de CFSE era 5 mM en DMSO. Se realizó una primera dilución 1/10 en PBS y se añadió el volumen necesario a las células para tener una concentración final de 5 μM . Se añadió CFSE, se mezcló suavemente y se incubó con las células a 37 °C durante 10 minutos y se dejó con la tapa abierta y se mezcló suavemente aproximadamente cada 2 minutos (las células se dividieron en 2 tubos para evitar la formación de coágulos y la muerte celular). Después de la incubación, se añadió RPMI con FBS al 5% para lavar las células, se lavó 1x con RPMI sin FBS y 1x con PBS. Se realizó un recuento de células después del marcado con CFSE para un total de 300×10^6 células.

Las células se resuspendieron en PBS a $50 \times 10^6/\text{ml}$, y se inyectaron 10×10^6 células (200 μl /ratón) en la vena de la cola de ratones receptores congénicos CD45.1. Se mantuvo una fracción de células para la verificación mediante citometría de flujo del marcado con CFSE y la proporción de células T CFSE+ inyectadas. Las células se tiñeron con CPA anti-CD4.

El día 2, se inyectaron 20 μl de antígeno (OVA a 10 μg + 5 μg en LPS o nanopartículas estabilizadas con PLURONIC conjugadas a OVA de 25 nm a 10 μg) en las almohadillas de las patas delanteras de los ratones receptores. El día 5, los ratones se sacrificaron y de cada ratón se extrajeron los ganglios linfáticos braquiales y axilares y se agruparon para formar suspensiones celulares. Las células se tiñeron para CD45.2 PE, yoduro de propidio (células muertas) y alofocianina CD4. Se realizó una citometría de flujo para medir la proliferación de células T.

La figura 13 (izquierda) muestra que después de una inyección de PBS, todas las células T OT-II marcadas con CFSE se mantuvieron en un nivel de fluorescencia máximo. Sin embargo, después de la inyección del control positivo OVA con LPS (centro) y OVA conjugado a nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC (y, por tanto, hidroxiladas) de 25 nm, se produce una disminución significativa en la fluorescencia de las células T CD4. Esta disminución en la fluorescencia es indicativa de poblaciones hijas de células, que muestran menos fluorescencia que las poblaciones progenitoras. Hubo aproximadamente 7 ciclos de proliferación después de la inyección de OVA con LPS u OVA conjugado con nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC.

Los ratones OT-II son transgénicos en el sentido de que poseen células T CD4 que regulan al alza el receptor de células T para OVA. Por lo tanto, estas células T son extremadamente sensibles cuando se encuentran con el antígeno OVA. Por lo tanto, la transferencia adoptiva de células T OT-II marcadas con CFSE en ratones WT constituye un modelo excelente para medir la proliferación de células T *in vivo*.

En el presente documento se demuestra que las CD de los ganglios linfáticos maduran después de la administración de OVA conjugado a nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, hidroxiladas) de 25 nm. Estos resultados muestran ahora que después de esta internalización de nanopartículas, el antígeno OVA se

procesa al menos parcialmente a través de la ruta MHC-II y su péptido antigénico es presentado por las CD maduras a las células T CD4. Las células T CD4, a su vez, se activan y proliferan. Las células T CD4 activadas son capaces de ayudar a las respuestas inmunitarias adaptativas (por ejemplo, presentando antígeno a las células B para la inducción de la producción de anticuerpos). Nuestros resultados demuestran que la OVA conjugada a las estabilizadas con PLURONIC (y por lo tanto, hidroxiladas y activadoras del complemento) de 25 nm es capaz de inducir la proliferación de células T a un nivel muy similar al control positivo OVA con LPS. Esto es significativo ya que sugiere que se producirán más respuestas inmunitarias mediadas por células T.

Ejemplo 15: Memoria de células T CD8-mediciones de inmunidad celular

Se inyectaron 25 nm nanopartículas estabilizadas con PLURONIC conjugadas con OVA, OVA en PBS y OVA con LPS en ratones C57/BL6 tal como se describe en el presente documento. Los ratones recibieron una inyección de refuerzo a los 7 días. A los 21 días, los ratones se sacrificaron y se extrajeron los ganglios linfáticos y las células se aislaron tal como se describe en el presente documento. Se realizó un recuento de las suspensiones celulares usando un hemocitómetro.

Se preparó una placa ELISPOT para IFN- γ (eBioscience) según el protocolo del fabricante. Se añadieron medios RPMI con suero de ratón al 10% a cada pocillo a 20 μ l/pocillo. A continuación, se añadieron 2 unidades de IL-2 y 0,4 μ g de CD28 a cada pocillo. A continuación, se añadieron 20 μ l/pocillo de péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ MHC-I a una concentración de 2 mM. Luego se añadieron células a los pocillos a 100 μ l/pocillo. Algunos pocillos no recibieron péptido OVA, como control no estimulado, mientras que otros pocillos recibieron PMA como control positivo. La placa se mantuvo en una incubadora a 37 °C durante 2 días. Después de 2 días, la placa ELISPOT se desarrolló según el protocolo del fabricante. Se tomaron imágenes de los pocillos con el estereoscopio Leica MZ16FA. Los puntos en los pocillos se contaron con el programa de análisis de imágenes Matlab.

Tal como se muestra en la figura 14, después de la inmunización de ratones, se utilizó un ensayo ELISPOT para determinar la cantidad de células T CD8 productoras de IFN- γ (medidas por medio de manchas en la placa) después de la reexposición al antígeno. Los ratones que recibieron inyecciones de OVA en PBS mostraron cifras muy reducidas de células T IFN- γ , mientras que hubo un aumento significativo en ratones a los que se inyectó OVA conjugada a nanopartículas estabilizadas con PLURONIC (y por lo tanto, hidroxiladas y activadoras del complemento) de 25 nm y control positivo OVA con LPS. De forma coherente con otros resultados presentados en el presente documento, la OVA conjugada a nanopartículas muy pequeñas (por ejemplo, 20-45 nm) que son activadoras del complemento (por ejemplo, nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, hidroxiladas)) son capaces de inducir la maduración de CD y la proliferación de células T CD4. En el presente documento mostramos que la OVA conjugada a nanopartículas de 25 nm estabilizadas con PLURONIC puede producir de forma suficiente memoria de células T CD8. Las células T CD8 responden al antígeno procesado y presentado por la ruta MHC-I. La ruta MHC-I se asocia generalmente con el antígeno que se procesa en el citoplasma de las CD. Esto sugiere que las nanopartículas pueden suministrar antígeno para el procesamiento y presentación de MHC-I y -II. Las células T CD8 también se conocen como células T asesinas citotóxicas, dado que atacan directamente al patógeno y a las células infectadas por patógenos. Por lo tanto, la capacidad de las nanopartículas activadoras del complemento pequeñas (por ejemplo, 20-45 nm) (por ejemplo, estabilizadas con PLURONIC) para producir memoria de células T CD8 muestra un gran potencial para utilizarla en vacunas.

Ejemplo 16: Títulos de anticuerpos (Ab) de inmunidad humoral

Se inyectaron en ratones C57/BL6 tal como se ha descrito anteriormente nanopartículas estabilizadas con PLURONIC (y, por tanto, hidroxiladas) conjugadas con OVA de 25 nm, nanopartículas estabilizadas con PLURONIC (y, por tanto, hidroxiladas) conjugadas con OVA de 100 nm, nanopartículas estabilizadas con PLURONIC terminado en metoxi (y, por lo tanto, no hidroxiladas) conjugadas con OVA de 25 nm, OVA en PBS y OVA con LPS. Se inyectaron en ratones C3-/- nanopartículas estabilizadas con PLURONIC (y por lo tanto, hidroxiladas) conjugadas con OVA de 25 nm y OVA con LPS. El suero se aisló de sangre tomada de ratones antes de las inyecciones y a los 21 d después de la inyección y se almacenó a -20 °C hasta su uso. No hubo inyecciones de refuerzo.

Se recubrieron placas de 96 pocillos (Becton Dickinson) con OVA en PBS (2 μ g/ml) a 100 μ l/pocillo. Las placas se dejaron toda la noche a temperatura ambiente (TA). El antígeno no unido se retiró mediante sacudida y la placa se lavó 3x con 200 μ l/pocillo de agua DI. Las placas se bloquearon después durante 1,5 horas a TA con 200 μ l/pocillo de tampón de bloqueo.

Las muestras de suero de ratón se diluyeron de forma seriada a partir de 1:10³ hasta 1:10⁸ en tampón de bloqueo.

Cuando las placas terminaron de bloquearse, se lavaron 3x con 150 μ l/pocillo de tampón de lavado. Después se añadieron muestras de suero a los pocillos a 50 μ l/pocillo durante 2 horas a TA. Las muestras de suero preinyectadas se añadieron por triplicado. Las muestras se retiraron después mediante sacudida y la placa se lavó con tampón de lavado 5x a 150 μ l/pocillo. Se diluyó HRP anti-IgG de ratón en tampón de bloqueo 1:3000 y se añadió a 50 μ l/pocillo durante 2 horas a TA. El anticuerpo HRP se desprendió después y la placa se lavó con tampón de lavado 5x a 150 μ l/pocillo. A continuación, se añadió reactivo de sustrato HRP (R&D systems) a 100 μ l/pocillo en la

oscuridad durante 45 minutos a TA. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2 N. Después se midió la absorbancia de la placa en el lector de placas Tecan a 450 nm y 540 nm de longitud de onda. Los valores de fondo de 540 nm se restaron de 450 nm para obtener los valores finales. Se determinó una muestra positiva si el valor del suero después de la inyección era superior a un valor de corte. El valor de corte se calculó a partir del promedio por triplicado preinyectado más la desviación estándar multiplicada por 3. La dilución más elevada con un valor positivo se considera el valor del título del anticuerpo (Ab).

Los títulos log₁₀ de Ab IgG OVA se determinaron en ratones a los que se inyectaron diversos tratamientos, tal como se muestra en la figura 15. Los ratones a los que se inyectó el control negativo de OVA con PBS no mostraron títulos positivos. Los ratones a los que se inyectó el control positivo de OVA con LPS mostraron títulos positivos entre 3-6 en ratones tanto de tipo silvestre como C3^{-/-}. Las inyecciones de OVA conjugada con nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC de 25 nm produjeron títulos de 4, mientras que las inyecciones de OVA conjugada con nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC de 100 nm y OVA conjugada con nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC terminado en metoxi de 25 nm produjeron valores de títulos más bajos. Finalmente, los títulos de Ab de los animales tratados con OVA conjugada con nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC de 25 nm fueron significativamente menores en ratones C3^{-/-}.

La presencia de títulos de Ab OVA IgG es evidencia de inmunidad humoral. Una ruta para que se produzca este proceso es cuando las CD procesan antígeno y lo presentan a células T CD4, que después estimulan las células B para producir anticuerpos contra el antígeno. Se sabe que el suministro de antígeno proteico libre en ausencia de señales de peligro no es capaz de inducir de forma significativa inmunidad humoral, y nuestros resultados demuestran esto dado que OVA en PBS no produce títulos positivos. Sin embargo, un control positivo de OVA con LPS muestra un nivel significativo de títulos tanto en ratones de tipo silvestre como en ratones C3^{-/-}. Hemos demostrado en el presente documento que OVA conjugada a nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC (y, por lo tanto, hidroxiladas y activadoras del complemento) de 25 nm puede inducir la maduración de CD, la proliferación de células T y memoria de células T CD8. En el presente documento mostramos que OVA conjugada a nanopartículas estabilizadas con PLURONIC (y por lo tanto, hidroxiladas y activadoras del complemento) de 25 nm también puede inducir inmunidad humoral mediante la producción de títulos de IgG anti-OVA. Las OVA conjugadas con nanopartículas estabilizadas con PLURONIC de 100 nm no producen títulos positivos, lo que demuestra que el direccionamiento a los ganglios linfáticos es crucial para la inmunidad humoral inducida por nanopartículas. También las OVA conjugadas a nanopartículas estabilizadas con PLURONIC terminado en metoxi de 25 nm, que activan el complemento en una medida mucho menor, muestran valores de títulos de anticuerpos reducidos, lo que demuestra que el control de la química de superficie también es necesario para producir una respuesta inmunitaria fuerte de este tipo, mediada por la activación del complemento. Finalmente, se muestra que la activación del complemento desempeña un papel significativo en la inducción de inmunidad humoral, dado que las OVA conjugadas a nanopartículas de PPS estabilizadas con PLURONIC de 25 nm producen valores de título mucho más bajos en ratones C3^{-/-} que en ratones de tipo silvestre.

Estos resultados demuestran que las nanopartículas de las diversas formas de realización que se fabrican tal como se describe en el presente documento tienen un tamaño especial para operar a través del direccionamiento a los ganglios linfáticos y una química de superficie especial, es decir, capaz de llevar a cabo la activación del complemento (por ejemplo, hidroxilada, que puede obtenerse mediante la estabilización con PLURONIC y otros medios), se pueden utilizar para producir una fuerte inmunidad humoral dependiente de células T con un antígeno coinyectado. Lo que se demuestra en el presente documento es el caso en el que el antígeno se conjuga con la superficie de las nanopartículas; los procedimientos de adsorción para unir el antígeno a la superficie de las nanopartículas también serán eficaces. La inyección de antígeno con dichas nanopartículas también debería ser eficaz, aunque quizás en menor medida.

Ejemplo 17: Carga de fármaco hidrófobo

La carga de fármacos hidrófobos, por ejemplo dexametasona, se logró mediante un procedimiento de evaporación con disolvente adaptado [132,133]. En resumen, y a modo de ejemplo, el fármaco se añadió al disolvente diclorometano (1 mg/ml). Después se añadió 1 ml de suspensión de fármaco-disolvente a 1 ml de solución de nanopartículas de PPS a 20 mg/ml. Las emulsiones se agitaron continuamente en la oscuridad a temperatura ambiente para evaporar el disolvente. La eficacia de carga del fármaco se midió por GPC.

Estadística

La significancia estadística en los ejemplos se determinó mediante la realización de un ensayo t de Student de dos colas. Los resultados indican la media ± SD y se realizaron 3-8 experimentos para cada una de las condiciones.

Referencias

[1] J. Banchemau, R.M. Steinman, "Dendritic cells and the control of immunity", *Nature* 392(6673) (1998) 245-252.

- [2] J.G. Cyster, "Chemokines - Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs", *Science* 286(5447) (1999) 2098-2102.
- 5 [3] G.J. Randolph, V. Angeli, M.A. Swartz, "Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels", *Nature Reviews Immunology* 5 (Agosto de 2005) (2005) 617-628.
- [4] L. Bonifaz, D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M.C. Nussenzweig, R.M. Steinman, "Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8(+) T cell tolerance", *Journal of Experimental Medicine* 10 196(12) (2002) 1627-1638.
- [5] L.C. Bonifaz, D.P. Bonnyay, A. Charalambous, D.I. Darguste, S. Fujii, H. Soares, M.K. Brimnes, B. Moltedo, T.M. Moran, R.M. Steinman, "*In vivo* targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination", *J Exp Med* 199(6) (2004) 815-824.
- 15 [6] M.J. Copland, M.A. Baird, T. Rades, J.L. McKenzie, B. Becker, F. Reck, P.C. Tyler, N.M. Davies, "Liposomal delivery of antigen to human dendritic cells", *Vaccine* 21(9-10) (2003) 883-890.
- [7] P. Elamanchili, M. Diwan, M. Cao, J. Samuel, "Characterization of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) based nanoparticulate system for enhanced delivery of antigens to dendritic cells", *Vaccine* 22(19) (2004) 2406-2412.
- 20 [8] S. Faraasen, J. Voros, G. Csucs, M. Textor, H.P. Merkle, E. Walter, "Ligand-specific targeting of microspheres to phagocytes by surface modification with poly(L-lysine)-grafted poly(ethylene glycol) conjugate", *Pharm Res* 20(2) (2003) 237-246.
- 25 [9] Y.J. Kwon, E. James, N. Shastri, J.M. Frechet, "*In vivo* targeting of dendritic cells for activation of cellular immunity using vaccine carriers based on pH-responsive microparticles", *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(51) (2005) 18264-18268.
- [10] Y.J. Kwon, S.M. Standley, S.L. Goh, J.M. Frechet, "Enhanced antigen presentation and immunostimulation of dendritic cells using acid-degradable cationic nanoparticles", *J Control Release* 105(3) (2005) 199-212.
- 30 [11] Y.J. Kwon, S.M. Standley, A.P. Goodwin, E.R. Gillies, J.M. Frechet, "Directed antigen presentation using polymeric microparticulate carriers degradable at lysosomal pH for controlled immune responses", *Mol Pharm* 2(1) (2005) 83-91.
- 35 [12] C.L. van Broekhoven, C.R. Parish, C. Demangel, W.J. Britton, J.G. Altin, "Targeting dendritic cells with antigen-containing liposomes: a highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy", *Cancer Res* 64(12) (2004) 4357-4365.
- 40 [13] C. Wang, Q. Ge, D. Ting, D. Nguyen, H.R. Shen, J.Z. Chen, H.N. Eisen, J. Heller, R. Langer, D. Putnam, "Molecularly engineered poly(ortho ester) microspheres for enhanced delivery of DNA vaccines", *Nature Materials* 3(3) (2004) 190-196.
- [14] R.F. Wang, H.Y. Wang, "Enhancement of antitumor immunity by prolonging antigen presentation on dendritic cells", *Nature Biotechnology* 20(2) (2002) 149-154.
- 45 [15] N.S. Wilson, D. El-Sukkari, G.T. Belz, C.M. Smith, R.J. Steptoe, W.R. Heath, K. Shortman, J.A. Villadangos, "Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature", *Blood* 102(6) (2003) 2187-2194.
- 50 [16] M. Sixt, N. Kanazawa, M. Seig, T. Samson, G. Roos, D.P. Reinhardt, R. Pabst, M.B. Lutz, L. Sorokin, "The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node", *Immunity* 22(1) (2005) 19-29.
- 55 [17] D.W. Pack, "Timing is everything", *Nat Mater* 3(3) (2004) 133-134.
- [18] H.C. Probst, J. Lagnel, G. Kollias, M. van den Broek, "Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance", *Immunity* 18(5) (2003) 713-720.
- 60 [19] M.J. Copland, M.A. Baird, T. Rades, J.L. McKenzie, B. Becker, F. Reck, P.C. Tyler, N.M. Davies, "Liposomal delivery of antigen to human dendritic cells", *Vaccine* 21(9-10) (2003) 883-890.
- [20] M.A. Swartz, "The physiology of the lymphatic system", *Advanced Drug Delivery Reviews* 50(1-2) (2001) 3-20.
- 65

- [21] C.J.H. Porter, "Drug delivery to the lymphatic system", Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 14(4) (1997) 333-393.
- 5 [22] C.J.H. Porter, S.A. Charman, "Lymphatic transport of proteins after subcutaneous administration", Journal of Pharmaceutical Sciences 89(3) (2000) 297-310.
- [23] M. Papisov, R. Weissleder, "Drug delivery to lymphatic tissue", Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 13(1-2) (1996) 57-84.
- 10 [24] C. Oussoren, J. Zuidema, D.J.A. Crommelin, G. Storm, "Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection .2. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose", Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes 1328(2) (1997) 261-272.
- 15 [25] A.E. Hawley, S.S. Davis, L. Illum, "Targeting of Colloids to Lymph-Nodes - Influence of Lymphatic Physiology and Colloidal Characteristics", Advanced Drug Delivery Reviews 17(1) (1995) 129-148.
- [26] T.M. Allen, C.B. Hansen, L.S.S. Guo, "Subcutaneous Administration of Liposomes - a Comparison with the Intravenous and Intraperitoneal Routes of Injection", Biochimica Et Biophysica Acta 1150(1) (1993) 9-16.
- 20 [27] S.M. Moghimi, "Modulation of lymphatic distribution of subcutaneously injected poloxamer 407-coated nanospheres: the effect of the ethylene oxide chain configuration", Febs Letters 545(2-3) (2003) 241-244.
- [28] S.M. Moghimi, B. Bonnemain, "Subcutaneous and intravenous delivery of diagnostic agents to the lymphatic system: applications in lymphoscintigraphy and indirect lymphography", Advanced Drug Delivery Reviews 37(1-3) (1999) 295-312.
- 25 [29] Y. Nishioka, H. Yoshino, "Lymphatic targeting with nanoparticulate system", Advanced Drug Delivery Reviews 47(1) (2001) 55-64.
- [30] C. Oussoren, G. Storm, "Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration", Advanced Drug Delivery Reviews 50 (2001) 143-156.
- 30 [31] C. Oussoren, G. Storm, "Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection .3. Influence of surface modification with poly(ethyleneglycol)", Pharmaceutical Research 14(10) (1997) 1479-1484.
- 35 [32] S.M. Moghimi, A.E. Hawley, N.M. Christy, T. Gray, L. Illum, S.S. Davis, "Surface Engineered Nanospheres with Enhanced Drainage into Lymphatics and Uptake by Macrophages of the Regional Lymph-Nodes", Febs Letters 344(1) (1994) 25-30.
- 40 [33] A.E. Hawley, L. Illum, S.S. Davis, "Preparation of biodegradable, surface engineered PLGA nanospheres with enhanced lymphatic drainage and lymph node uptake", Pharmaceutical Research 14(5) (1997) 657-661.
- [34] A.E. Hawley, L. Illum, S.S. Davis, "Lymph node localisation of biodegradable nanospheres surface modified with poloxamer and poloxamine block co-polymers", Febs Letters 400(3) (1997) 319-323.
- 45 [35] L. Illum, A.E. Church, M.D. Butterworth, A. Arien, J. Whetstone, S.S. Davis, "Development of systems for targeting the regional lymph nodes for diagnostic imaging: *In vivo* behaviour of colloidal PEG-coated magnetite nanospheres in the rat following interstitial administration", Pharmaceutical Research 18(5) (2001) 640-645.
- 50 [36] C. Oussoren, M. Velinova, G. Scherphof, J.J. van der Want, N. van Rooijen, G. Storm, "Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection - IV. Fate of liposomes in regional lymph nodes", Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes 1370(2) (1998) 259-272.
- [37] C. Oussoren, G. Storm, "Role of macrophages in the localisation of liposomes in lymph nodes after subcutaneous administration", International Journal of Pharmaceutics 183(1) (1999) 37-41.
- 55 [38] D. Hawiger, K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J.V. Ravetch, R.M. Steinman, M.C. Nussenzweig, "Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions *in vivo*", Journal of Experimental Medicine 194(6) (2001) 769-779.
- 60 [39] A. Rehor, J.A. Hubbell, N. Tirelli, "Oxidation-sensitive polymeric nanoparticles", Langmuir 21(1) (2005) 411-417.
- [40] A. Rehor, N. Tirelli, J.A. Hubbell, "A new living emulsion polymerization mechanism: Episulfide anionic polymerization", Macromolecules 35(23) (2002) 8688-8693.
- 65

- [41] A. Napoli, M. Valentini, N. Tirelli, M. Muller, J.A. Hubbell, "Oxidation-responsive polymeric vesicles", Nature Materials 3(3) (2004) 183-189.
- 5 [42] W.L. Olszewski, "Lymph stasis pathophysiology, diagnosis and treatment", CRC Press, Boca Raton etc., 1991.
- [43] D.A. Berk, M.A. Swartz, A.J. Leu, R.K. Jain, "Transport in lymphatic capillaries .2. Microscopic velocity measurement with fluorescence photobleaching", American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 39(1) (1996) H330-H337.
- 10 [44] M.A. Swartz, D.A. Berk, R.K. Jain, "Transport in lymphatic capillaries .1. Macroscopic measurements using residence time distribution theory", American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 39(1) (1996) H324-H329.
- 15 [45] M.A. Swartz, A. Kaipainen, P.A. Netti, C. Brekken, Y. Boucher, A.J. Grodzinsky, R.K. Jain, "Mechanics of interstitial-lymphatic fluid transport: theoretical foundation and experimental validation", Journal of Biomechanics 32(12) (1999) 1297-1307.
- 20 [46] V. Angeli, J. Llodra, J.X. Rong, K. Satoh, S. Ishii, T. Shimizu, E.A. Fisher, G.J. Randolph, "Dyslipidemia associated with atherosclerotic disease systemically alters dendritic cell mobilization", Immunity 21(4) (2004) 561-574.
- [47] R.P. da Silva, S. Gordon, "Phagocytosis stimulates alternative glycosylation of macrosialin (mouse CD68), a macrophage-specific endosomal protein", Biochem J 338 (Pt 3) (1999) 687-694.
- 25 [48] C.L. Holness, R.P. da Silva, J. Fawcett, S. Gordon, D.L. Simmons, "Macrosialin, a mouse macrophage-restricted glycoprotein, is a member of the lamp/lgp family", J Biol Chem 268(13) (1993) 9661-9666.
- [49] S. Rabinowitz, H. Horstmann, S. Gordon, G. Griffiths, "Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages", J Cell Biol 116(1) (1992) 95-112.
- 30 [50] S. S. Rabinowitz, S. Gordon, "Macrosialin, a macrophage-restricted membrane sialoprotein differentially glycosylated in response to inflammatory stimuli", J Exp Med 174(4) (1991) 827-836.
- [51] M. Breel, R.E. Mebius, G. Kraal, "Dendritic Cells of the Mouse Recognized by 2 Monoclonal-Antibodies", European Journal of Immunology 17(11) (1987) 1555-1559.
- 35 [52] K. Inaba, W.J. Swiggard, M. Inaba, J. Meltzer, A. Mirza, T. Sasagawa, M.C. Nussenzweig, R.M. Steinman, "Tissue Distribution of the Dec-205 Protein That Is Detected by the Monoclonal-Antibody N1dc-145 .1. Expression on Dendritic Cells and Other Subsets of Mouse Leukocytes", Cellular Immunology 163(1) (1995) 148-156.
- 40 [53] W.P. Jiang, W.J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R.M. Steinman, M.C. Nussenzweig, "The Receptor Dec-205 Expressed by Dendritic Cells and Thymic Epithelial-Cells Is Involved in Antigen-Processing", Nature 375(6527) (1995) 151-155.
- 45 [54] W.P. Jiang, W.J. Swiggard, A. Mirza, M. Peng, R.M. Steinman, M.C. Nussenzweig, "Molecular Characterization of a 205-Kd Protein That Is Abundant on Dendritic Cells and Identified with the N1dc-145 Monoclonal-Antibody", Journal of Cellular Biochemistry (1995) 20-20.
- [55] G. Kraal, M. Breel, M. Janse, G. Bruin, "Langerhans Cells, Veiled Cells, and Interdigitating Cells in the Mouse Recognized by a Monoclonal-Antibody", Journal of Experimental Medicine 163(4) (1986) 981-997.
- 50 [56] K. Mahnke, M. Guo, S. Lee, H. Sepulveda, S.L. Swain, M. Nussenzweig, R.M. Steinman, "The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments", Journal of Cell Biology 151(3) (2000) 673-683.
- 55 [57] Y. Tabata, Y. Ikada, "Phagocytosis of Polymer Microspheres by Macrophages", Advances in Polymer Science 94 (1990) 107-141.
- [100] S. Cerritelli, A. Fontana, D. Velluto, M. Adrian, J. Dubochet, P. De Maria, J.A. Hubbell, "Thermodynamic and kinetic effects in the aggregation behavior of a poly(ethylene glycol-b-propylene sulfide-b-ethylene glycol) ABA triblock copolymer", Macromolecules 38(18) (2005) 7845-7851.
- 60 [102] A. Napoli, N. Tirelli, G. Kilcher, J.A. Hubbell, "New synthetic methodologies for amphiphilic multiblock copolymers of ethylene glycol and propylene sulfide", Macromolecules 34(26) (2001) 8913-8917.
- 65

- [103] A. Napoli, N. Tirelli, E. Wehrli, J.A. Hubbell, "Lyotropic behavior in water of amphiphilic ABA triblock copolymers based on poly(propylene sulfide) and poly(ethylene glycol)", Langmuir 18(22) (2002) 8324-8329.
- 5 [104] A. Napoli, M. Valentini, N. Tirelli, M. Muller, J.A. Hubbell, "Oxidation-responsive polymeric vesicles", Nature Materials 3(3) (2004) 183-189.
- [105] K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, "Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance", Adv Drug Deliv Rev 47(1) (2001) 113-131.
- 10 [106] A.N. Lukyanov, V.P. Torchilin, "Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs", Adv Drug Deliv Rev 56(9) (2004) 1273-1289.
- [107] H. Otsuka, Y. Nagasaki, K. Kataoka, "PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications", Adv Drug Deliv Rev 55(3) (2003) 403-419.
- 15 [108] D.E. Discher, A. Eisenberg, "Polymer vesicles", Science 297(5583) (2002) 967-973.
- [109] H. Lee, I.H. Jang, S.H. Ryu, T.G. Park, "N-terminal site-specific mono-PEGylation of epidermal growth factor", Pharm Res 20(5) (2003) 818-825.
- 20 [110] H. Lee, T.G. Park, "Preparation and characterization of mono-PEGylated epidermal growth factor: evaluation of *in vitro* biologic activity", Pharm Res 19(6) (2002) 845-851.
- [111] M.J. Roberts, M.D. Bentley, J.M. Harris, "Chemistry for peptide and protein PEGylation", Adv Drug Deliv Rev 54(4) (2002) 459-476.
- 25 [112] C.A. Janeway, "Immunobiology 5 the immune system in health and disease", Churchill Livingstone, Edinburgh, 2001.
- [113] L.C. Bonifaz, D.P. Bonnyay, A. Charalambous, D.I. Darguste, S. Fujii, H. Soares, M.K. Brimnes, B. Moltedo, T.M. Moran, R.M. Steinman, "*In vivo* targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination", J Exp Med 199(6) (2004) 815-824.
- 30 [114] D. Hawiger, K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J.V. Ravetch, R.M. Steinman, M.C. Nussenzweig, "Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions *in vivo*", Journal of Experimental Medicine 194(6) (2001) 769-779.
- 35 [115] C.L. van Broekhoven, C.R. Parish, C. Demangel, W.J. Britton, J.G. Altin, "Targeting dendritic cells with antigen-containing liposomes: a highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy", Cancer Res 64(12) (2004) 4357-4365.
- 40 [116] T. Fifis, A. Gamvrellis, B. Crimeen-Irwin, G.A. Pietersz, J. Li, P.L. Mottram, I.F. McKenzie, M. Plebanski. "Size dependant immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors", J Immunol 173 (2004) 3148-3154.
- 45 [117] M. Gadjeva, A.W. Dodds, A. Taniguchi-Sidle, A.C. Willis, D.E. Isenman, S.K.A. Law. "The covalent binding reaction of complement component C3", J Immunol 161 (1998) 985-990.
- [118] A. Kidane and K. Park. "Complement activation by PEO-grafted glass surfaces", J Biomed Mat Res 48 (1999) 640-647.
- 50 [119] D.T. O'Hagan and N.M. Valiante. "Recent advances in the discover and delivery of vaccine adjuvants", Nat Rev Drug Disc 2 (2003) 727-738.
- 55 [120] R.J. Ulevitch. "Therapeutics targeting the innate immune system", Nat Rev Immunol 4 (2004) 512-520.
- [121] A. Pashine, N.M. Valiante, J.B. Ulmer. "Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants", Nat Med 11(4) (2005) 563-568.
- 60 [122]. Janeway, C.A. "Immunobiology 5 the immune system in health and disease" (Churchill Livingstone, Edinburgh, 2001).
- [123] Larsen, C. P. et al. "Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways". Nature 381 (1996), 434-8.
- 65

- [124] Hackstein, H. & Thomson, A.W. "Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs". Nat Rev Immunol 4(2004), 24-34.
- 5 [125] Duperrier, K. et al. "Immunosuppressive agents mediate reduced allostimulatory properties of myeloid-derived dendritic cells despite induction of divergent molecular phenotypes". Mol Immunol 42 (2005), 1531-40.
- [126] Piemonti, L. et al. "Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation". J Immunol 162 (1999), 6473-81.
- 10 [127] K. Duperrier, A. Farre, J. Bienvenu, N. Bleyzac, J. Bernaud, L. Gebuhrer, D. Rigal, A. Eljaafari, "Cyclosporin A inhibits dendritic cell maturation promoted by TNF-alpha or LPS but not by double-stranded RNA or CD40L", J Leukoc Biol 72(5) (2002) 953-961.
- [128] J.I. Lee, R.W. Ganster, D.A. Geller, G.J. Burckart, A.W. Thomson, L. Lu, "Cyclosporine A inhibits the expression of costimulatory molecules on *in vitro*-generated dendritic cells: association with reduced nuclear translocation of nuclear factor kappa B", Transplantation 68(9) (1999) 1255-1263.
- 15 [129] A. Panhans-Gross, N. Novak, S. Kraft, T. Bieber, "Human epidermal Langerhans' cells are targets for the immunosuppressive macrolide tacrolimus (FK506)", J Allergy Clin Immunol 107(2) (2001) 345-352.
- 20 [130] G. Szabo, C. Gavala, P. Mandrekar, "Tacrolimus and cyclosporine A inhibit allostimulatory capacity and cytokine production of human myeloid dendritic cells", J Investig Med 49(5) (2001) 442-449.
- [131] A.M. Woltman, J.W. de Fijter, S.W. Kamerling, L.C. Paul, M.R. Daha, C. van Kooten, "The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells", Eur J Immunol 30(7) (2000) 1807-1812.
- 25 [132] G. Kwon, M. Naito, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, "Block copolymer micelles for drug delivery: loading and release of doxorubicin", Journal of Controlled Release 48 (1997) 195-201.
- 30 [133] G.S. Kwon, M. Naito, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, "Physical entrapment of adriamycin in AB block copolymer micelles", Pharm Res 12(2) (1995) 192-195.
- [134] M.B. Villiers, C.L. Villiers, A.M. Laharie, P.N. Marche, "Different stimulating effects of complement C3b and complete Freund's adjuvant on antibody response", Immunopharmac 42 (1999) 151-157.
- 35 [135] P.W. Dempsey, M.E. Allison, S. Akkaraju, C.C. Goodnow, D.T. Fearon, "C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity", Science 271(5247) (1996) 348-350.
- [136] K.M. Haas, F.R. Toapanta, J.A. Olivier, J.C. Poe, J.H. Weis, D.R. Karp, J.F. Bower, T.M. Ross, T.F. Tedder. "C3d functions as a molecular-adjuvant in the absence of CD21/35 expression", J Immunol 172(10) (2004) 5833-5837.
- 40 [137] C.H. Nielsen, E.M. Fischer, R.G.Q. Leslie. "The role of complement in the acquired immune response", Immunology 100 (2000) 4-12.
- 45 [138] M. Kopf, B. Abel, A. Gallimore, M. Carroll, M.F. Bachmann. "Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection", Nat Med 8(4) (2002) 373-378.
- [139] T. Segura, L.D. Shea. "Surface tethered DNA complexes for enhanced gene delivery", Bioconj Chem, 13(3) (2002) 621-629.
- 50 [140] D. Putnam. "Polymers for gene delivery across length scales", Nat Mat, 5 (2006) 439-451.
- [141] H. Kobayashi, M.W. Brechbiel. "Nano-sized MRI contrast agents with dendrimer cores", Adv Drug Delivery Rev, 57 (2005) 2271-2286.
- 55 [142] T. Dutta, N.K. Jain. "Targeting potential and anti-HIV activity of lamivudine loaded mannoxyated poly(propyleneimine) dendrimer". Biochim Biophys Acta xx (2007) xxx-xxx.
- 60 [143] A.K. Patri, A. Myc, J. Beals, T.P. Thomas, N.H. Bander, J.R. Baker. "Synthesis and *in vitro* testing of J591 antibody-dendrimer conjugates for targeted prostate cancer therapy". Bioconjugate Chem 15 (2004) 1174-1181.
- [144] C. Plank, K. Mechtler, F.C. Szoka, E. Wagner. "Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery". Hum. Gene Ther, 7 (1996) 1437-1446.
- 65 [145] R. Duncan, L. Izzo. "Dendrimer biocompatibility and toxicity". Adv. Drug Delivery Rev, 57 (2005) 2215-2237.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de nanopartículas que comprende: una colección aislada de partículas sintéticas que comprenden un antígeno y un polímero sintético que comprende polietilenglicol eficaz para activar la maduración de células dendríticas, en la que la colección tiene un diámetro medio de partícula de 20 nm a 70 nm.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la colección tiene un diámetro medio de partícula de 20-45 nm.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que el antígeno está unido covalentemente a la partícula.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el polímero sintético carece de señales de peligro biológico.
- 15 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el polímero sintético comprende el polietilenglicol y además una porción hidrófoba que se adsorbe en una porción hidrófoba de un segundo polímero biodegradable que forma el núcleo de la nanopartícula para unir de esta forma el polímero sintético al núcleo.
6. La composición de la reivindicación 5, en la que el segundo polímero es poli(sulfuro de propileno).
- 20 7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el antígeno es un polipéptido.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo además las partículas una señal de peligro elegida del grupo que consiste en citoquinas inflamatorias y ligandos para receptores tipo Toll.
- 25 9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el antígeno está unido covalentemente a la partícula y el polímero sintético carece de secuencias de aminoácidos o secuencias de sacáridos que activan el complemento.
- 30 10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el polímero sintético comprende al menos un bloque hidrófobo y al menos un bloque hidrófilo del polietilenglicol, en la que el copolímero sintético se autoensambla en soluciones acuosas formando las partículas.
11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que las partículas son biodegradables.
- 35 12. El uso de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la fabricación de un medicamento para estimular un sistema inmunitario de un paciente.
- 40 13. La composición de las reivindicaciones 1 a 11, en la que las partículas comprenden además un fármaco inmunosupresor.

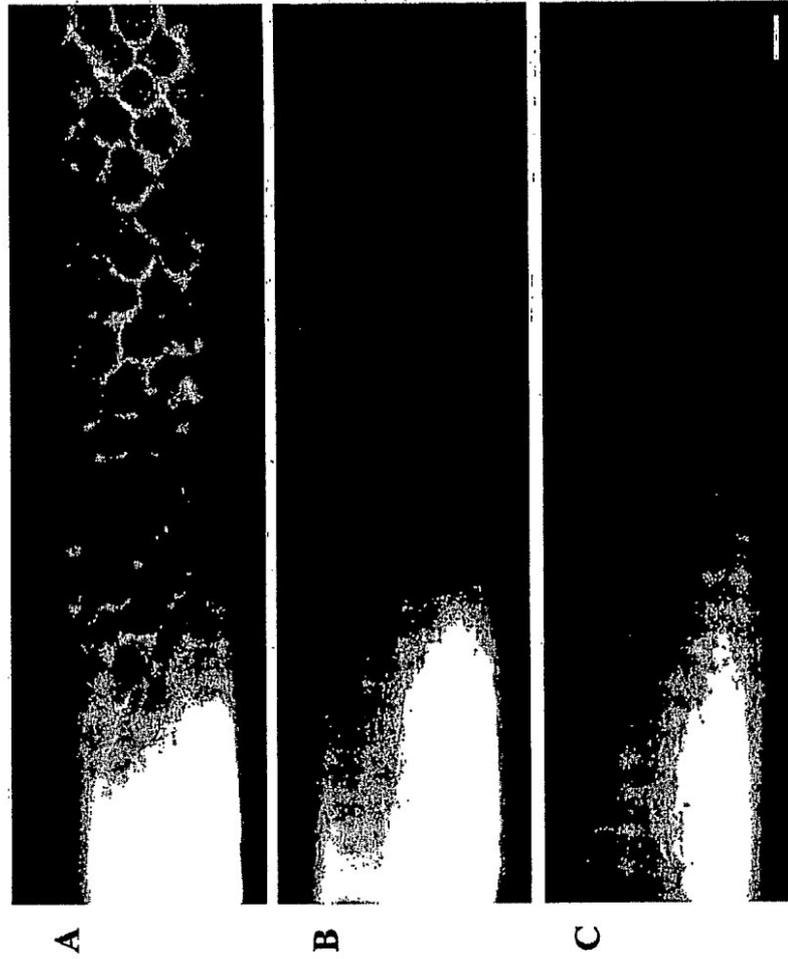


Figura 1

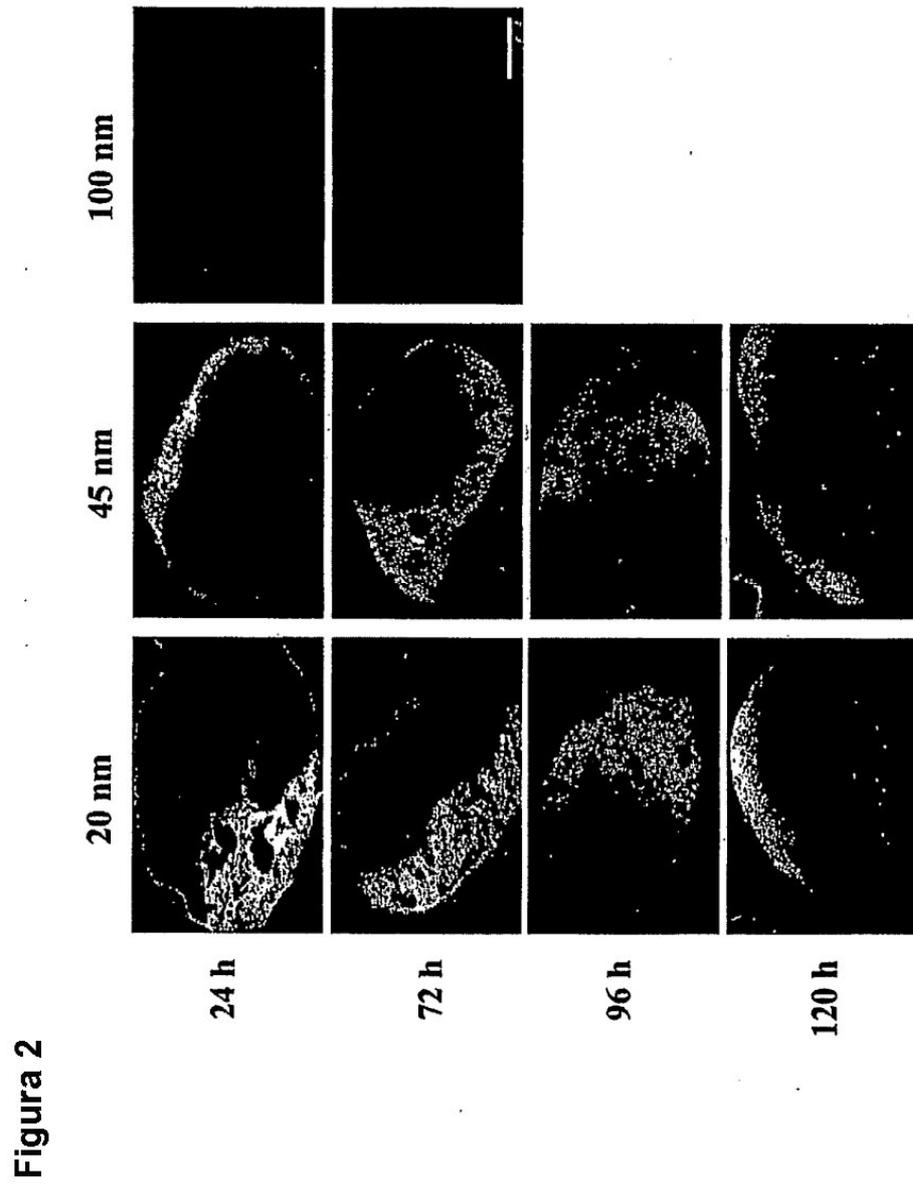
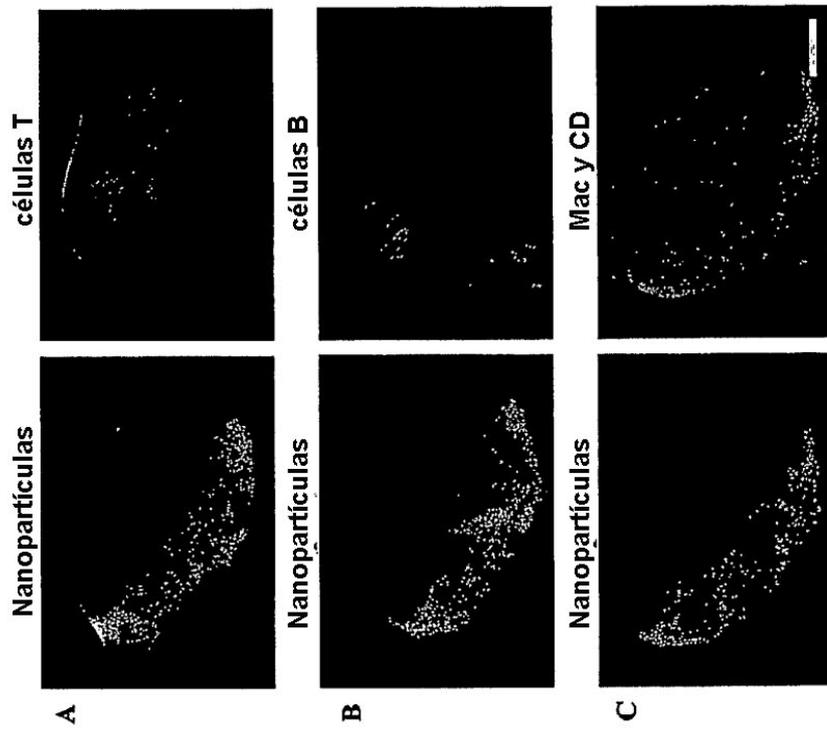


Figura 3



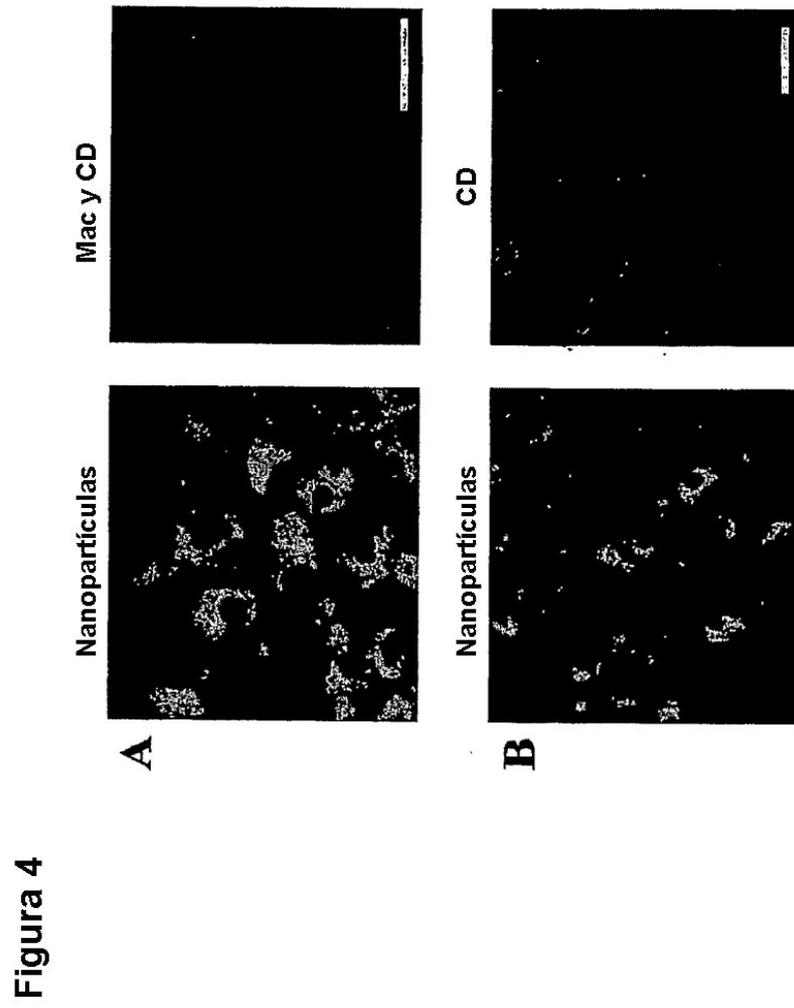
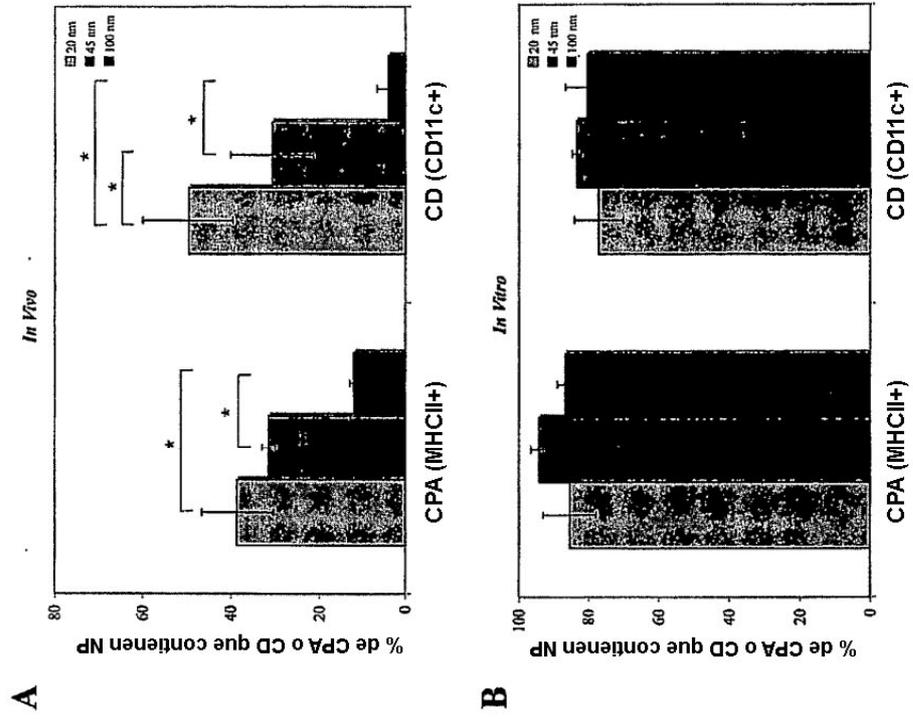


Figura 5



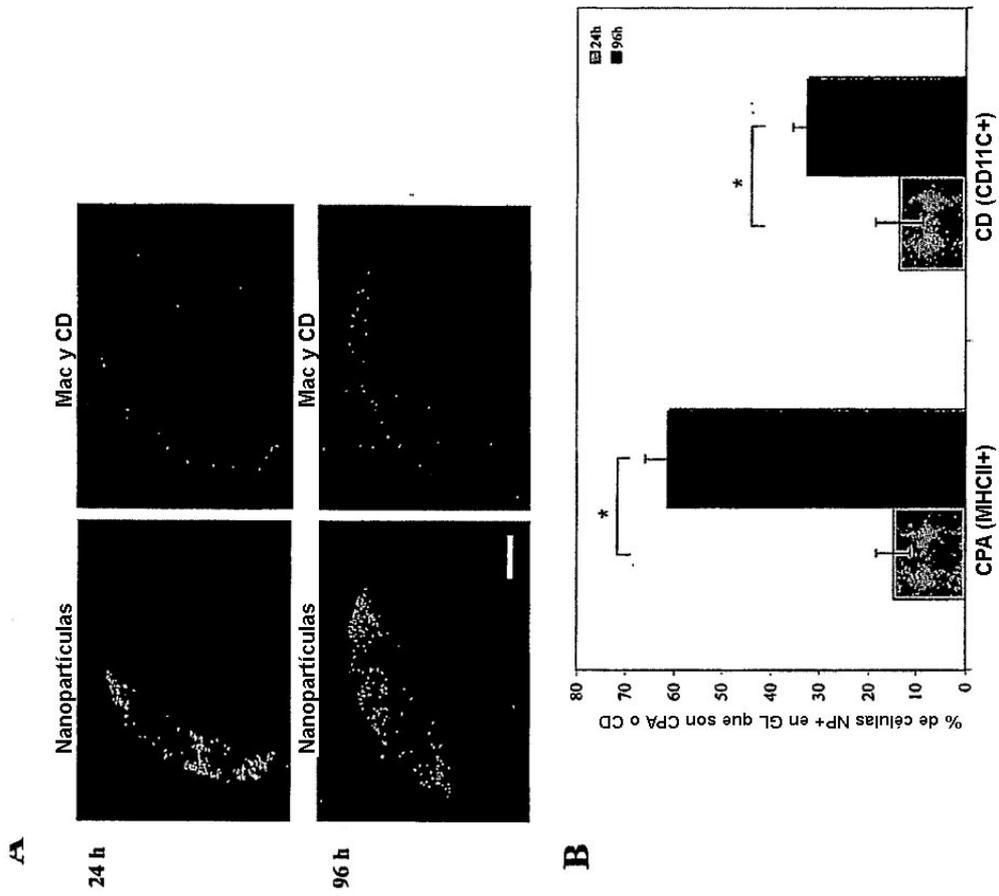


Figura 6

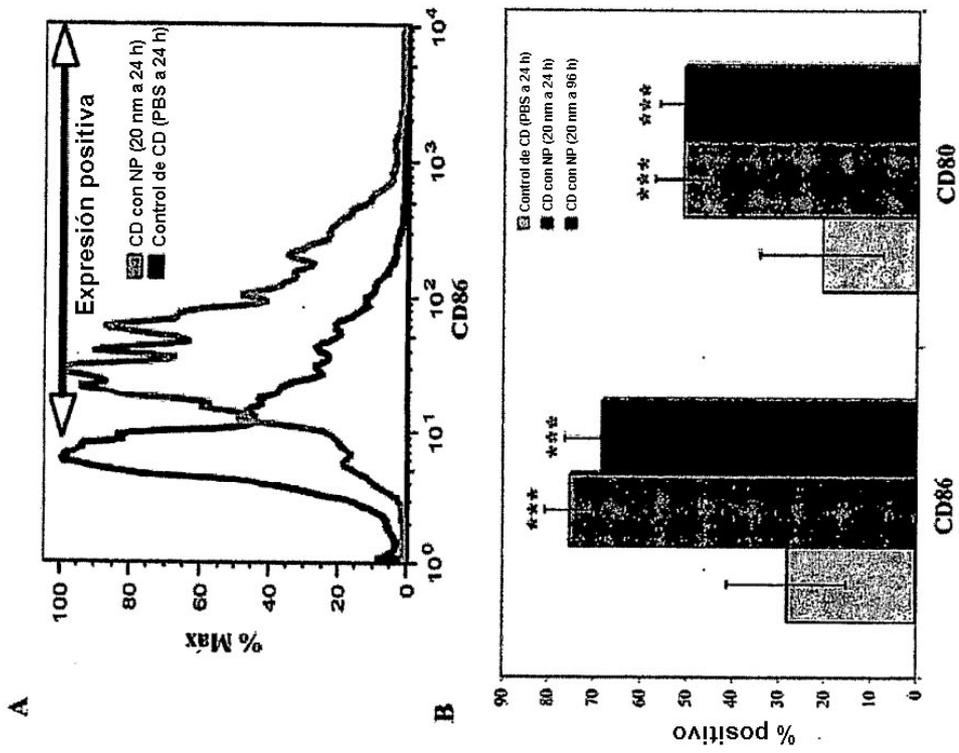


Figura 7

Figura 8

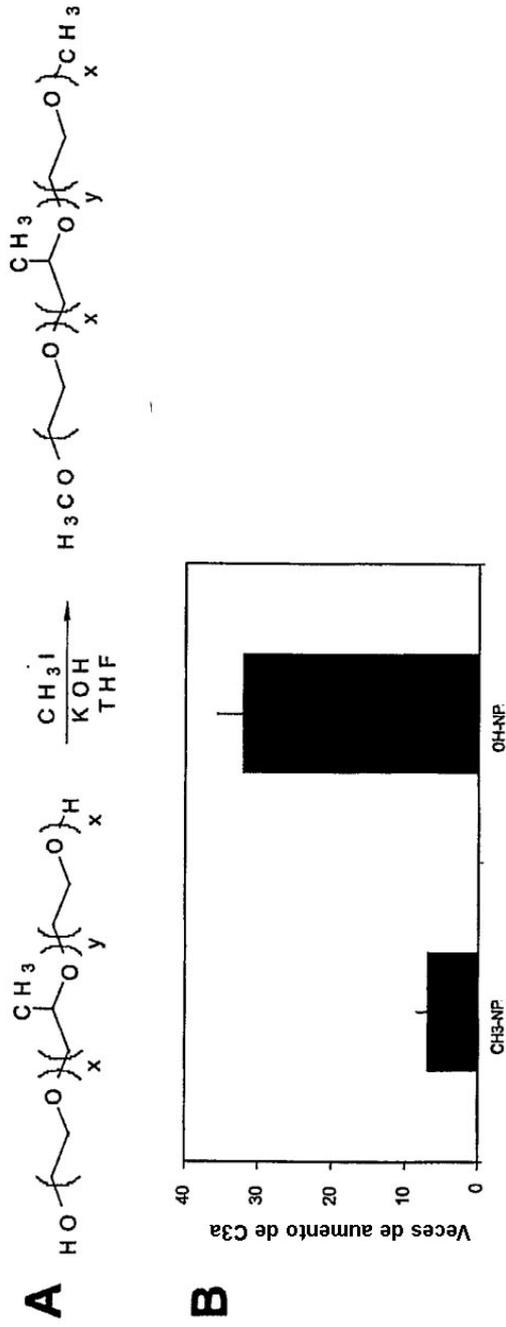


Figura 9

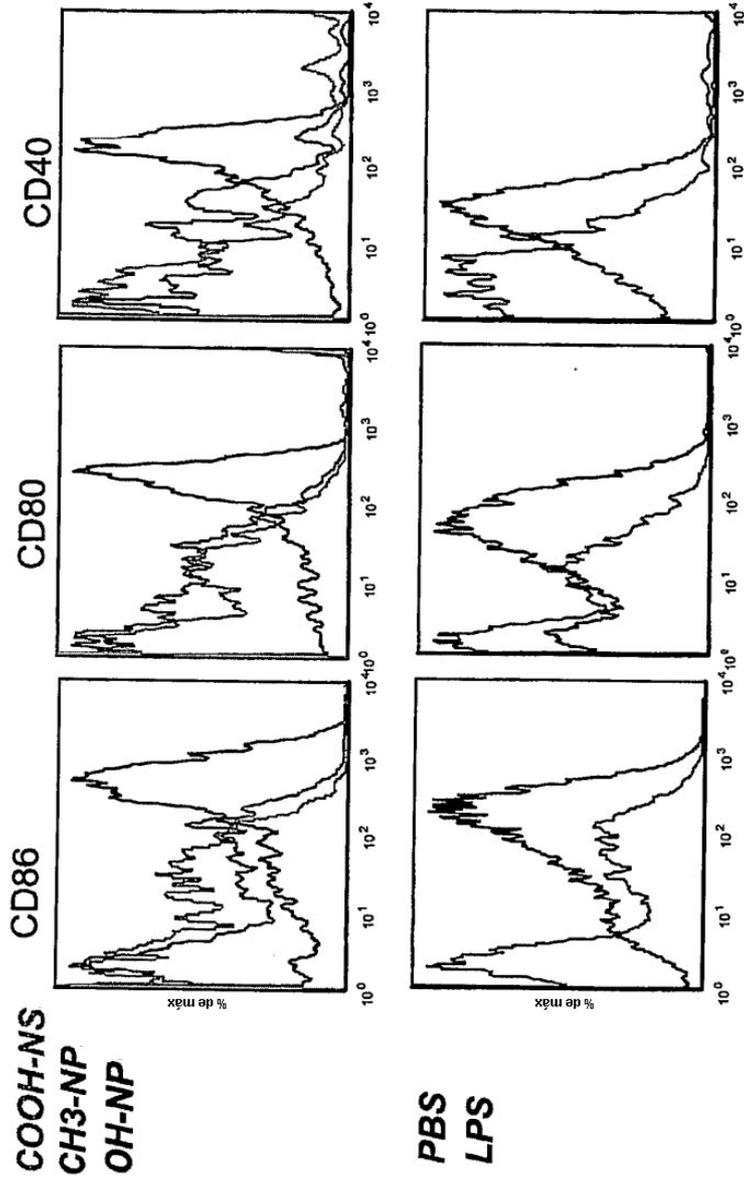


Figura 10

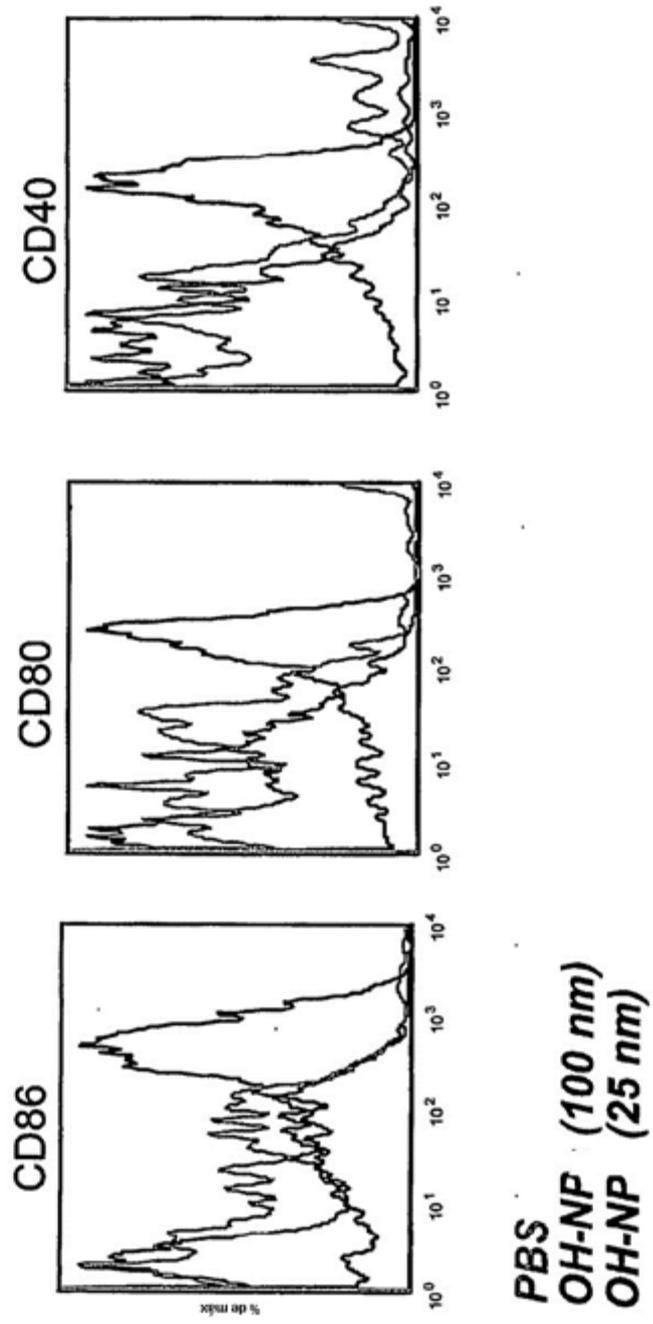


Figura 11

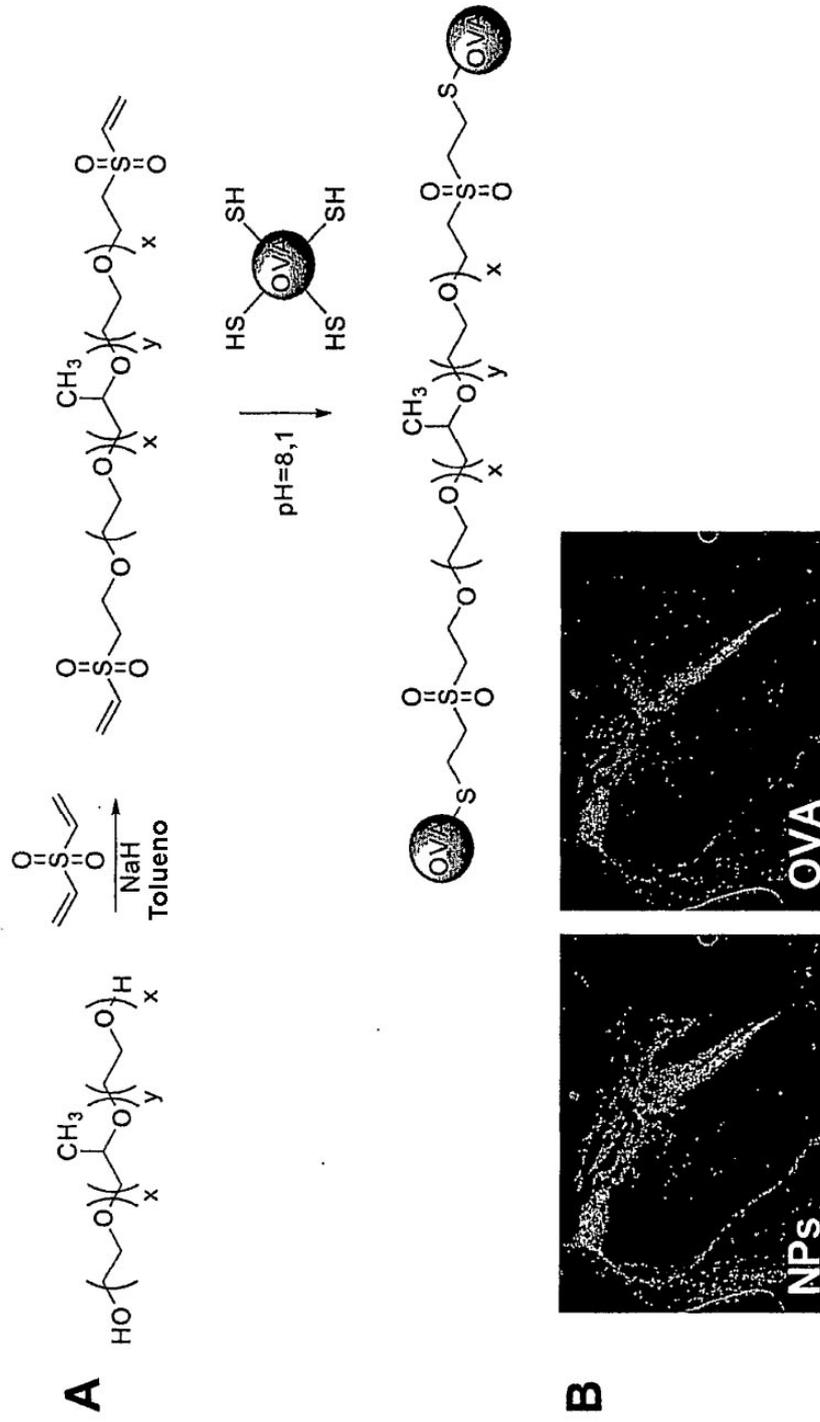


Figura 12

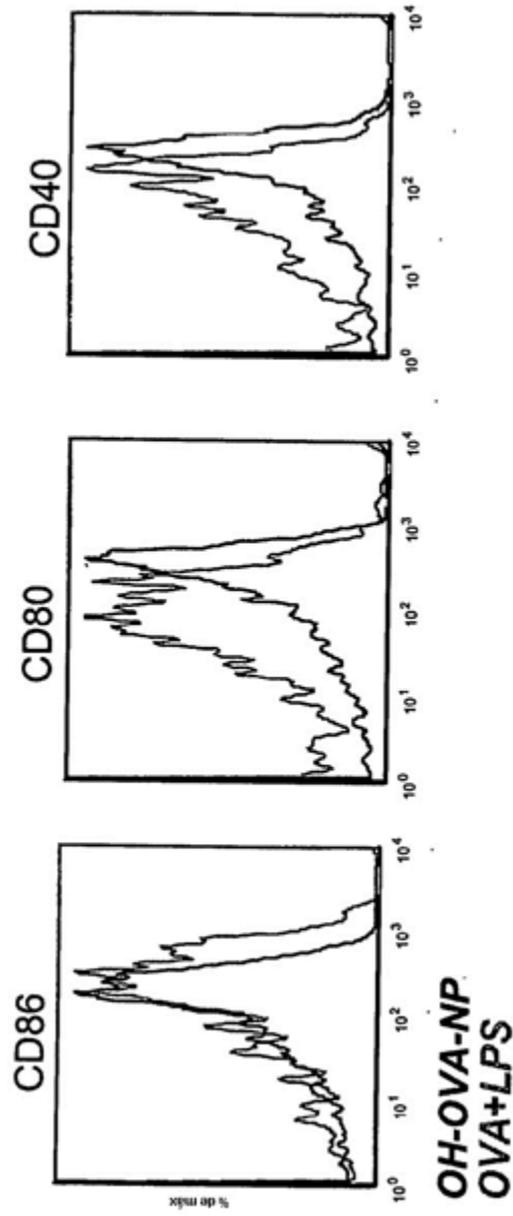


Figure 13

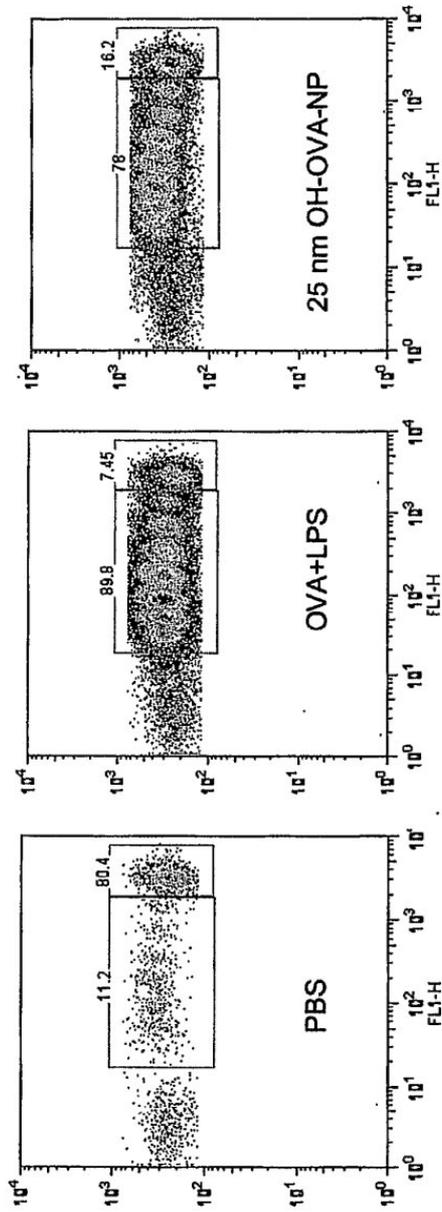


Figura 14

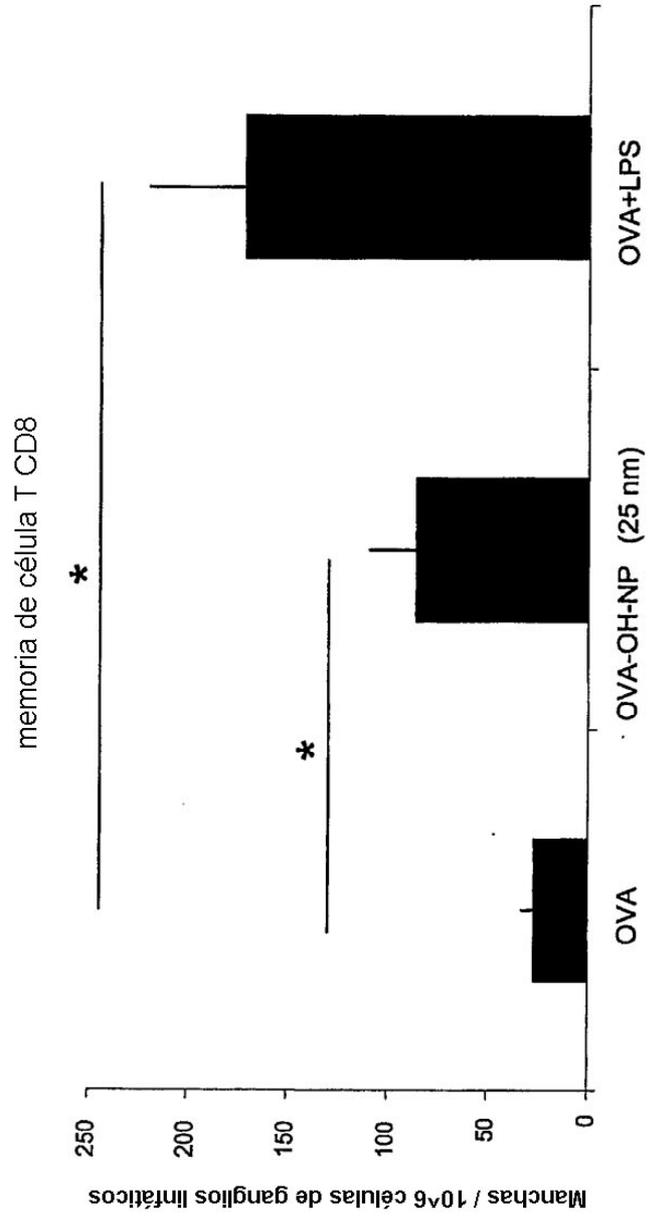


Figura 15

