

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 688**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 14/47</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/14</b>	(2006.01)
<b>A61P 21/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 25/28</b>	(2006.01)
<b>A61P 37/04</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/74</b>	(2006.01)
<b>C07K 17/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 7/06</b>	(2006.01)
<b>C07K 7/08</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2013 PCT/IB2013/003033**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2014 WO14080286**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2013 E 13856460 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2906594**

54 Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento de la esclerosis múltiple y trastornos asociados**

30 Prioridad:

**11.10.2012 US 201261712733 P**  
**14.03.2013 US 201313830521**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.05.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SANTAMARIA, PEDRO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 712 688 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para el tratamiento de la esclerosis múltiple y trastornos asociados

### Referencia cruzada con solicitud relacionada

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de conformidad con 35 U.S.C. § 119 (e) del documento de Solicitud Provisional de EE.UU. nº 61/712.733, presentado el 11 de octubre de 2012 y del nº de serie de EE.UU. 13/830.521, presentado el 14 de marzo de 2013.

### Campo de la descripción

10 Esta descripción se dirige a composiciones y a métodos relacionados con la inmunoterapia y la medicina. En particular, esta descripción está relacionada con agentes terapéuticos para el tratamiento de la esclerosis múltiple y trastornos relacionados.

### Antecedentes

15 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad potencialmente debilitante en la que el sistema inmune del cuerpo destruye la vaina protectora que cubre nuestros nervios. Esto interfiere con la comunicación entre el cerebro y el resto del cuerpo. En última instancia, esto puede dar lugar a un deterioro de los propios nervios, un proceso que no es reversible.

20 Las estadísticas muestran que aproximadamente a 250.000 a 350.000 personas en los Estados Unidos se les ha diagnosticado esa enfermedad. Los síntomas varían ampliamente, dependiendo de la cantidad de daño y de qué nervios están afectados. Las personas con casos graves de esclerosis múltiple pueden perder la capacidad de caminar o de hablar. Los síntomas de la EM incluyen un entumecimiento en los brazos o las piernas, dolor, pérdida de visión, debilidad muscular o temblores, parálisis, vértigo, fatiga, dificultad para hablar, disfunción de la vejiga, depresión, pérdida de la audición y picazón.

25 No existe una cura para la EM, pero se han encontrado ciertos medicamentos para aliviar los ataques de EM y posiblemente retardar la enfermedad. Los tratamientos intentan devolver la función después de un ataque, prevenir nuevos ataques y prevenir la discapacidad. Los medicamentos de la EM pueden tener efectos adversos o ser mal tolerados. El documento WO 2010/085509 A1 describe una composición para la inducción de tolerancia específica de antígeno que comprende una nanopartícula de soporte fijada a péptidos antigénicos tales como la proteína básica de la mielina, específica de la esclerosis múltiple. Una molécula de señalización apoptótica es el principal agente de tolerancia. Tales moléculas se pueden asociar con efectos secundarios significativos.

En consecuencia, existe una necesidad en la técnica de terapias mejor toleradas, más eficaces para la EM.

### 30 Compendio

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

35 Como respuesta a una necesidad en la técnica, en esta memoria se describen métodos terapéuticos y composiciones para tratar o prevenir la esclerosis múltiple o trastornos relacionados con la esclerosis múltiple. Un aspecto de la descripción se refiere a un método para expandir y/o desarrollar poblaciones de linfocitos T autorreactivos antipatógenos en un sujeto con esclerosis múltiple o un trastorno relacionado con la esclerosis múltiple, en donde el método comprende, consiste esencialmente o consiste además también en administrar a ese sujeto un complejo de antígeno-MHC-nanopartícula, en donde el antígeno es un antígeno relacionado con la esclerosis múltiple.

40 Un aspecto adicional se refiere a un método para el tratamiento de la esclerosis múltiple o un trastorno relacionado con la esclerosis múltiple en un sujeto que lo requiere que comprende, consiste esencialmente o consiste además también en administrar una cantidad eficaz de un complejo de antígeno-MHC-nanopartícula al sujeto, en donde el antígeno es un antígeno relacionado con la esclerosis múltiple.

45 Otros aspectos se refieren a un complejo que comprende, consiste esencialmente o consiste además también en una nanopartícula; una proteína del MHC; y un antígeno relacionado con la esclerosis múltiple. También se proporcionan composiciones que comprenden, consisten esencialmente o consisten además también en el antígeno-MHC-nanopartícula como se describe en esta memoria y un vehículo. Otros aspectos adicionales se refieren a kits que comprenden, consisten esencialmente o consisten además también en composiciones de antígeno-MHC-nanopartícula descritas en esta memoria e instrucciones de uso.

### Descripción de los dibujos

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

- La FIG. 1 muestra que la terapia con pMHC de clase II-NP reduce la gravedad de una EAE establecida en ratones C57BL/6. Ratones B6 fueron inmunizados con pMOG<sub>35-55</sub> en CFA y se trataron con toxina pertussis por vía i.v. Los ratones recibieron una puntuación de los signos de EAE utilizando criterios establecidos a través de una escala de 15 puntos. Los ratones afectados se trataron con dos dosis semanales de 7,5-22,5 µg de NPs recubiertas con pMOG<sub>38-49</sub>/IA<sup>b</sup>, comenzando 21 días después de la inmunización.
- La FIG. 2 demuestra que los ratones con EAE crónica tratados con una terapia de pMHC de clase II-NP (NPs recubiertas con pMOG<sub>38-49</sub>/I-A<sup>b</sup>) tienen un peso incrementado en comparación con los ratones con EAE sin tratar.
- La FIG. 3 es una fotografía de los ratones con EAE tratados y sin tratar. Los ratones tratados (NAVACIM) aparecen más sanos que los ratones sin tratar.
- La FIG. 4 muestra la expansión sistémica de linfocitos T CD4<sup>+</sup> autorreguladores cognados mediante NPs recubiertas con pMOG<sub>38-49</sub>/IA<sup>b</sup> en ratones C57BL/6 afectados por EAE. La magnitud de la expansión en este modelo es comparable a la observada en los ratones NOD tratados con NPs recubiertas con pMHC de clase II relevante para la diabetes de tipo 1 diabetes (véase, por ejemplo, el documento de Patente de EE.UU. n° 8.354.110).
- La FIG. 5 representa las médulas espinales de ratones sin tratar. Los ratones sin tratar mostraban una desmielinización significativa e infiltrados de células mononucleares densas de la sustancia blanca.
- La FIG. 6 representa las médulas espinales de ratones tratados con pMOG<sub>38-49</sub>/IA<sup>b</sup>-NPs. Los ratones tratados con pMHC-NP tenían significativamente menos desmielinización e infiltrados de células mononucleares.
- La FIG. 7 muestra ejemplos representativos de los bordes de la médula espinal de 2 ratones con EAE sin tratar.
- La FIG. 8 muestra ejemplos representativos de los bordes de la médula espinal de 2 ratones con EAE tratados con pMOG<sub>38-49</sub>/IA<sup>b</sup>-NPs. Los ratones tratados con pMHC-NP tienen significativamente menos desmielinización, así como menos infiltración de células mononucleares.
- La FIG. 9 muestra la secuencias proteica (SEQ ID NO: 2) y de ADN (SEQ ID NO: 3) de la estructura artificial pMOG<sub>36-55</sub>-I-Abeta (b)-C-Jun (SEQ ID NOS: 2 y 3, respectivamente, en orden de aparición). Las secuencias de los componentes individuales en la proteína de fusión son líder HA (subrayado) seguido de la secuencia del péptido pMOG<sub>38-49</sub> (subrayado doble), la secuencia de I-Abeta (b) (subrayado punteado) y C-Jun (sombreado). Los enlazadores GS no se resaltan.
- La FIG. 10 es un mapa del ADN del vector que contiene el antígeno. Los sitios de la estructura artificial de ADN que codifican la proteína de fusión líder HA-I-Aalfa (b) -C Fos-BirA-His X 6 (284 aa) ("His X 6" se describe como SEQ ID NO: 18) se clonaron en el vector de expresión de célula de mosca pMT/V5 entre Nco I (854) hasta Xba I (1711). La proteína de fusión incluye I-Aalfa (d) (195 aa), seguido de C-Fos a través de un enlazador GS (6 aa) y después la secuencia BirA y His 6 X (SEQ ID NO: 18).
- La FIG. 11 muestra la imagen TEM representativa de NPs de oro recubiertas con pMHC (~14 nm) concentradas a densidades altas (~5x10<sup>13</sup>/ml) y monodispersadas. Mag: 50.000X.
- La FIG. 12 muestra los efectos de la dosis de pMHC (GNP) y de la valencia de pMHC sobre las propiedades agonistas de NPs recubiertas con pMHC. La Figura compara las cantidades de IFN $\gamma$  secretadas por linfocitos T 8.3-CD8<sup>+</sup> cognados como respuesta a dos muestras de pMHC-NP diferentes (ambas consisten en ~2x10<sup>13</sup> NPs de 14 nm de diámetro/ml). Au-022410 y Au-21910 eran portadoras de ~250 y ~120 pMHCs/NP, respectivamente. Au-011810-C era portadora de ~120 pMHCs/NP de control.
- La FIG. 13 demuestra la secreción inducida por pMHC-NP de IFN $\gamma$  a través de linfocitos T 8.3-CD8<sup>+</sup> como una función de la valencia de pMHC. Linfocitos T 8.3-CD8<sup>+</sup> (2,5x10<sup>5</sup> células/ml) se cultivaron con cantidades en aumento de NPs recubiertas con tres valencias diferentes de IGRP<sub>206-214</sub>/K<sup>d</sup>. IGRP<sub>206-214</sub> comprende el péptido antigénico VYLKTNVFL (SEQ ID NO: 19).
- La FIG. 14 muestra que la actividad agonista inferior de las pMHC-NPs se puede compensar mediante el aumento de la densidad de pMHC-NP pero solo por encima de un umbral de valencia de pMHC. El gráfico compara la actividad agonista de tres preparaciones diferentes de pMHC-NP (que son portadoras de tres valencias diferentes de pMHC) en un intervalo de densidades de NP. Obsérvese que las NPs que son portadoras de 8 pMHCs, a diferencia de las que son portadoras de 11 pMHCs, no pueden desencadenar adecuadamente la secreción IFN $\gamma$  incluso con densidades altas de pMHC-NP, en comparación con NPs que son portadoras de 11 y 54 pMHCs por NP.
- La FIG. 15 muestra los efectos del umbral de la valencia de pMHC sobre las propiedades agonistas de pMHC-NPs como una función del aporte total de pMHC.
- La FIG. 16 muestra los efectos de la valencia de pMHC sobre la actividad agonista de pMHC-NPs producidas con núcleos de NP de óxido de hierro más grandes.
- La FIG. 17 muestra el efecto del tamaño sobre la actividad agonista. Au-0224-15 eran GNPs de 14 nm recubiertas con

una valencia relativamente baja de pMHC pero preparadas con una densidad elevada; Au-0323-40 eran GNPs de 40 nm recubiertas con una valencia alta de pMHC pero con densidad baja. Au-0224-15 tenía una actividad agonista superior que la muestra Au-0323-40.

5 La FIG. 18 muestra el efecto de PEGs protectores sobre la función de pMHC-GNPs. Au-021910 consistía en  $\sim 2 \times 10^{13}$  GNPs de 14 nm de diámetro/ml protegidas mediante tiol-PEGs de 2 kD y recubiertas con  $\sim 20$  pMHCs/GNP. Au-012810 GNPs (también  $\sim 2 \times 10^{13}$  GNP/ml de 14 nm) estaban protegidas mediante tiol-PEGs de 5 kD y se recubrieron con  $\sim 175$  pMHCs/GNP. La muestra de Au-021910 tenía una actividad agonista superior.

10 La FIG. 19 muestra la expansión eficaz de los linfocitos T CD8+ reactivos con NRP-V7 mediante NPs de oro recubiertas con NRP-V7/Kd. Se emplearon  $3 \times 10^{12}$  NPs ( $\sim 10$  nm de tamaño) que eran portadoras de 25  $\mu$ g de pMHC (150 pMHC/NP). Se trataron ratones NOD de 10 semanas de edad pre-diabéticos con dos inyecciones semanales de NPs de oro recubiertas con NRP-V7/kd durante 5 semanas. El tetrámero TUM/Kd es un control negativo. Cada columna de paneles corresponde a un ratón diferente.

15 La FIG. 20 representa la gran expansión de linfocitos T CD8+ cognados en ratones tratados con NPs recubiertas con pMHC. Se emplearon  $3 \times 10^{12}$  IGRP<sub>206-214</sub>/K<sup>D</sup>-NPs ( $\sim 10$  nm de tamaño) que eran portadoras de 25  $\mu$ g de pMHC (150 pMHC/NP). Panel superior: perfil de un ratón sacrificado después de 4 dosis. Panel inferior: perfil de dos ratones diferentes después de 10 inyecciones (sangre solamente).

20 La FIG. 21 demuestra que los mismos principios para los complejos de pMHC de clase I-Np se aplican a Nps recubiertas con pMHC de clase II (véase la FIG. 18). Obsérvese que pMHC de clase II-Nps (partículas de nanopartículas de 6-8 nm recubiertas con BDC2.5mi (SFPZ) recubiertas con 17 pMHCs tienen mayor actividad agonista que las partículas PFM (20-25 nm) recubiertas con 53 pMHCs por NP. Esto confirma que tanto con Nps con pMHC de clase I como con Nps con pMHC de clase II, lo que importa no es la valencia absoluta de pMHC, sino más bien la densidad de pMHC. Como se demuestra por la secreción incrementada de IFN $\gamma$  inducida por pMHC-NP mediante linfocitos T CD4+ como una función de la densidad de pMHC.

### Descripción detallada

25 Se ha de entender que esta invención no se limita a realizaciones particulares descritas ya que, por supuesto, pueden variar. Se ha de entender también que la terminología usada en esta memoria es solo con el fin de describir realizaciones particulares y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

30 Hay que señalar que, tal y como se usa en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un excipiente" incluye una pluralidad de excipientes.

#### I. Definiciones

35 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en esta memoria tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente cualquier experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Tal y como se usan en esta memoria, los siguientes términos tienen los siguientes significados.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la expresión "que comprende" o el término "comprende" significa que las composiciones y los métodos incluyen los elementos citados, sin excluir a otros.

40 "Que consiste esencialmente en", cuando se usa para definir composiciones y métodos, significa excluir otros elementos con cualquier significado esencial para la combinación para el propósito declarado. Por lo tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se definen en esta memoria, no excluiría otros materiales o etapas que no afecten materialmente a la o las características básicas y novedosas de la invención reivindicada, tales como composiciones para tratar o prevenir la esclerosis múltiple. "Que consiste en" significa excluir más que los oligoelementos de otros ingredientes y las etapas sustanciales del método. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

45 Por "biocompatible" se entiende que los componentes del sistema de administración no causarán una lesión tisular o una lesión en el sistema biológico humano. Para impartir biocompatibilidad, se utilizarán preferentemente los polímeros y excipientes que han mostrado antecedentes de uso seguro en seres humanos o con el estado GRAS (Generalmente Aceptado como Seguro). Por biocompatibilidad se entiende que los ingredientes y excipientes usados en la composición serán finalmente "bioabsorbidos" o eliminados por el cuerpo sin efectos adversos para el cuerpo. Para que una composición sea biocompatible y se considere no tóxica, no debe causar toxicidad a las células. De forma similar, el término "bioabsorbible" se refiere a nanopartículas hechas de materiales que se someten a una bioabsorción *in vivo* durante un periodo de tiempo tal, que se evita una acumulación a largo plazo del material en el paciente. En una realización preferida, la nanopartícula biocompatible es bioabsorbida durante un periodo de menos de 2 años, preferiblemente menos de 1 año e incluso más preferiblemente menos de 6 meses. La tasa de bioabsorción está relacionada con el tamaño de la partícula, el material utilizado y otros factores bien reconocidos por los expertos en la técnica. Se puede usar una mezcla de materiales biocompatibles y bioabsorbibles para formar las nanopartículas usadas en

50

55

esta invención. En una realización, se puede combinar óxido de hierro y un polímero biocompatible y bioabsorbible. Por ejemplo, el óxido de hierro y PGLA se pueden combinar para formar una nanopartícula.

5 Un complejo de antígeno/MHC/nanopartícula se refiere a la presentación de un péptido, carbohidrato, lípido u otro segmento, fragmento o epítipo antigénico de una molécula o proteína antigénica (es decir, autopéptido o autoantígeno) sobre una superficie, tal como una nanoesfera biocompatible y biodegradable. "Antígeno", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a todo, una parte, un fragmento o un segmento de una molécula que puede inducir una respuesta inmune en un sujeto o una expansión de células antipatogénicas.

10 El término "aproximadamente", cuando se usa antes de una designación numérica, por ejemplo, temperatura, tiempo, cantidad y concentración, incluyendo un intervalo, indica aproximaciones que pueden variar en (+) o (-) un 10%, 5% o 1%.

15 Un "mímico" es un análogo de un ligando o péptido dado, en donde el análogo es sustancialmente similar al ligando. "Sustancialmente similar" significa que el análogo tiene un perfil de unión similar al ligando, excepto que el mímico tiene uno o varios grupos funcionales o modificaciones que representan colectivamente menos de aproximadamente 50%, menos de aproximadamente 40%, menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 10% o menos de aproximadamente 5% del peso molecular del ligando.

20 La esclerosis múltiple (EM) es también conocida como "esclerosis diseminada," "encefalomielitis diseminada" o "encefalomielitis alérgica". La EM es una enfermedad inflamatoria en la que las vainas de mielina grasas que rodean los axones del cerebro y la médula espinal están dañadas, dando lugar a una desmielinización y cicatrización, así como a un amplio espectro de signos y síntomas. Los trastornos relacionados con la esclerosis múltiple incluyen, por ejemplo, neuromielitis óptica (NMO), uveítis, dolor neuropático y similares.

25 La "glicoproteína oligodendrocítica de la mielina" (MOG) es una glicoproteína que se cree que es importante en el proceso de mielinización de los nervios en el sistema nervioso central (SNC). En los seres humanos, esta proteína está codificada por el gen *MOG*. Se especula que sirve como una "molécula de adhesión" necesaria para proporcionar una integridad estructural a la vaina de mielina y se sabe que se desarrolla tarde en el oligodendrocito. Los números de registro del GenBank NM\_001008228.2 y NP\_001008229.1 representan la secuencia de ARNm y de la proteína, respectivamente, del gen *MOG*.

30 La expresión "linfocito T autorreactivo antipatógeno" se refiere a un linfocito T con propiedades antipatogénicas (es decir, linfocitos T que neutralizan la EM). Estos linfocitos T pueden incluir linfocitos T antiinflamatorios, linfocitos T efectoros, linfocitos T de memoria, linfocitos T de baja avidéz, linfocitos T auxiliares, linfocitos T autorreguladores, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T citolíticos naturales, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y similares.

35 La expresión "linfocito T antiinflamatorio" se refiere a un linfocito T que promueve una respuesta antiinflamatoria. La función antiinflamatoria del linfocito T se puede llevar a cabo mediante la producción y/o la secreción de proteínas antiinflamatorias, citocinas, quimiocinas y similares. Las proteínas antiinflamatorias también se entiende que incluyen señales antiproliferativas que suprimen las respuestas inmunes. Las proteínas antiinflamatorias incluyen IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1ra, G-CSF y receptores solubles para TNF e IL-6. En ciertas realizaciones, la administración del complejo de antígeno-MHC-nanopartícula conduce a una expansión y o aumento de la inducción de linfocitos T antiinflamatorios eficaces para el tratamiento de la esclerosis múltiple. Por consiguiente, unos aspectos de la descripción se refieren a métodos para tratar, en un paciente, una inflamación asociada con la EM, comprendiendo el método, consistiendo fundamentalmente o además consistiendo adicionalmente en administrar a ese paciente un complejo de antígeno-MHC-nanopartícula en donde el antígeno es un antígeno relacionado con la esclerosis múltiple.

40 El término "IL-10" o "interleucina-10" se refiere a una citocina codificada por el gen de IL-10. La secuencia de IL-10 está representada por el número de registro en el GenBank NM\_000572.2 (ARNm) y NP\_000563.1 (proteína).

45 El término "TGF- $\beta$ " o "factor de crecimiento transformante beta" se refiere a una proteína que puede tener un efecto antiinflamatorio. TGF- $\beta$  es una proteína secretada que existe en al menos tres isoformas, denominadas TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. También era el nombre original para TGF- $\beta$ 1, que fue el miembro fundador de esta familia. La familia de TGF- $\beta$  es parte de una superfamilia de proteínas conocidas como la superfamilia de factor de crecimiento transformante beta, que incluye inhibinas, activina, hormona antimulleriana, proteína morfogenética ósea, decapentaplegic y Vg-1.

50 Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para conseguir el objetivo pretendido, ejemplos no limitantes del mismo incluyen: iniciación de la respuesta inmune, modulación de la respuesta inmune, supresión de una respuesta inflamatoria y modulación de la actividad de linfocitos T o poblaciones de linfocitos T. En un aspecto, la cantidad eficaz es una que funciona para lograr un fin terapéutico indicado, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz. Como se describe en esta memoria en detalle, la cantidad eficaz o la dosificación, depende del fin y de la composición, del componente y se puede determinar de acuerdo con la presente descripción.

55 El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva, puede significar "uno", pero también es compatible con el significado de "uno o varios", "al menos uno" y "uno o más de uno".

- 5 Por "nanoesfera", "NP" o "nanopartícula" en esta memoria, se entiende una pequeña partícula discreta que se administra individualmente o de forma plural a un sujeto, muestra celular o muestra de tejido, según proceda. En ciertas realizaciones, las nanopartículas tienen una forma sustancialmente esférica. En ciertas realizaciones, la nanopartícula no es un liposoma o una partícula vírica. En realizaciones adicionales, la nanopartícula es sólida. La expresión "sustancialmente esférica", tal y como se emplea en esta memoria, significa que la forma de las partículas no se desvía de la de una esfera en más de aproximadamente un 10%. Varios complejos conocidos de antígenos o péptidos de la invención se pueden aplicar a las partículas. Las nanopartículas de esta invención varían en tamaño desde aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1 µm y, preferiblemente, desde aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm y en algunos aspectos se refiere al diámetro promedio o la mediana de una pluralidad de nanopartículas, cuando se desea una pluralidad de nanopartículas. Las partículas más pequeñas de tamaño nanométrico se pueden obtener, por ejemplo, mediante el procedimiento de fraccionamiento mediante el cual se permite que las partículas más grandes se sedimenten en una solución acuosa. La porción superior de la solución se recupera a continuación mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Esta porción superior está enriquecida con partículas de tamaño más pequeño. El procedimiento se puede repetir hasta que se genera un tamaño promedio deseado.
- 15 El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere solamente a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la descripción apoya una definición que se refiere solo a alternativas y a "y/o".

20 Tal y como se usa en esta memoria, la expresión "respuesta inmune" o su equivalente "respuesta inmunológica" se refiere al desarrollo de una respuesta mediada por células (mediada por linfocitos T específicos de antígeno o sus productos de secreción). Una respuesta inmune celular se provoca por la presentación de epítopos polipeptídicos en asociación con moléculas del MHC de clase I o de clase II, para activar linfocitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> específicos de antígeno y/o linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>. La respuesta también puede implicar la activación de otros componentes.

25 Las expresiones "respuesta inflamatoria" e "inflamación", tal y como se emplean en esta memoria, indican la respuesta biológica compleja de los tejidos vasculares de un individuo frente a estímulos nocivos, tales como agentes patógenos, células dañadas o agentes irritantes, e incluye la secreción de citocinas y más particularmente de citocinas proinflamatorias, es decir, citocinas que se producen predominantemente por células inmunes activadas y están implicadas en la amplificación de reacciones inflamatorias. Las citocinas proinflamatorias a modo de ejemplo incluyen pero no se limitan a IL-1, IL-6, TNF-α, IL-17, IL21, IL23 y TGF-β. Las inflamaciones a modo de ejemplo incluyen la inflamación aguda y la inflamación crónica. Una inflamación aguda indica un proceso a corto plazo que se caracteriza por los signos clásicos de la inflamación (hinchazón, enrojecimiento, dolor, calor y pérdida de función) debido a la infiltración de los tejidos con plasma y leucocitos. Una inflamación aguda se produce normalmente siempre que el estímulo nocivo está presente y cesa una vez que el estímulo se ha retirado, destruido o eliminado por cicatrización (fibrosis). La inflamación crónica indica un estado caracterizado por una inflamación concurrente activa, destrucción de tejido e intentos de reparación. Una inflamación crónica no se caracteriza por los signos clásicos de inflamación aguda enumerados anteriormente. En su lugar, un tejido inflamado de forma crónica se caracteriza por la infiltración de células mononucleares inmunes (monocitos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas), destrucción de tejido e intentos de curación, que incluyen angiogénesis y fibrosis. Una inflamación se puede inhibir en el sentido de la presente descripción, afectando y en particular inhibiendo cualquiera de los eventos que forman la compleja respuesta biológica asociada a una inflamación en un individuo.

40 Las expresiones "epítipo" y "determinante antigénico" se usan indistintamente para referirse a un sitio en un antígeno al cual responden o reconocen los linfocitos B y/o linfocitos T. Los epítopos de linfocitos B se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos, yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente se conservan durante una exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario, normalmente se pierden durante un tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye normalmente al menos 3 y más habitualmente al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen cristalografía de rayos X, por ejemplo, y resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones. Véase, por ejemplo, Glenn E. Morris, Epitope Mapping Protocols (1996). Los linfocitos T reconocen epítopos continuos de aproximadamente nueve aminoácidos para los linfocitos CD8 o de aproximadamente 13-15 aminoácidos para los linfocitos CD4. Los linfocitos T que reconocen el epítipo se pueden identificar mediante ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígeno, tal y como se determina mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina por linfocitos T cebados, como respuesta a un epítipo (Burke et al., J. Inf. Dis., 170: 1110-1119, 1994), mediante una destrucción dependiente de antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos, Tigges et al., J. Immunol, 156(10):3901-3910, 1996) o mediante la secreción de citocinas. La presencia de una respuesta inmunológica mediada por células se puede determinar mediante ensayos de proliferación (linfocitos T CD4<sup>+</sup>) o ensayos de CTL (linfocitos T citotóxicos).

55 Opcionalmente, un antígeno o, preferiblemente, un epítipo de un antígeno, se puede conjugar químicamente o expresar como una proteína de fusión con otras proteínas, tales como proteínas del MHC y proteínas relacionadas con el MHC.

60 Tal y como se usa en esta memoria, los términos "paciente" y "sujeto" se utilizan como sinónimos y se refieren a un mamífero. En algunas realizaciones el paciente es un ser humano. En otras realizaciones el paciente es un mamífero

comúnmente utilizado en un laboratorio, tal como ratón, rata, simio, canino, felino, bovino, equino u ovino.

Tal y como se utiliza en esta solicitud, el término "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que, o bien es recombinante o se ha aislado exenta de ácido nucleico genómico total. Dentro del término "polinucleótido" se incluyen oligonucleótidos (ácidos nucleicos con una longitud de 100 residuos o menos), vectores recombinantes, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus y similares. Los polinucleótidos incluyen, en ciertos aspectos, secuencias reguladoras, aisladas sustancialmente apartadas de sus genes de origen natural o secuencias que codifican proteínas. Los polinucleótidos pueden ser ARN, ADN, análogos de los mismos o una combinación de los mismos. Un ácido nucleico que codifica todo o parte de un polipéptido, puede contener una secuencia de ácido nucleico contigua que codifica la totalidad o una porción de un polipéptido de ese tipo con las siguientes longitudes: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1095, 1100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 9000, 10000 o más nucleótidos, nucleósidos o pares de bases. También se contempla que un polipéptido particular procedente de una especie dada puede estar codificado por ácidos nucleicos que contienen variaciones naturales que tienen secuencias de ácido nucleico ligeramente diferentes pero, sin embargo, codifican la misma o sustancialmente la misma proteína, polipéptido o péptido.

Un polinucleótido está compuesto por una secuencia específica de cuatro bases de nucleótidos: adenina (A); citosina (C); guanina (G); timina (T); y uracilo (U) en lugar de la timina cuando el polinucleótido es ARN. Por lo tanto, la expresión "secuencia de polinucleótido" es la representación alfabética de una molécula de polinucleótido. Esta representación alfabética se puede introducir en bases de datos en un ordenador que tiene una unidad de procesamiento central y utilizarse para aplicaciones bioinformáticas tales como la genómica funcional y la búsqueda de homologías.

El término "aislado" o "recombinante" tal y como se usa en esta memoria con respecto a los ácidos nucleicos, tales como ADN o ARN, se refiere a moléculas distintas de otros ADNs o ARNs, respectivamente, que están presentes en la fuente natural de la macromolécula, así como polipéptidos. La expresión "ácido nucleico aislado o recombinante" se entiende que incluye fragmentos de ácido nucleico que no son de origen natural como fragmentos y que no se encontrarían en estado natural. El término "aislado" también se utiliza en esta memoria para referirse a polinucleótidos, polipéptidos y proteínas que se aíslan a partir de otras proteínas celulares y se entiende que incluyen polipéptidos tanto purificados como recombinantes. En otras realizaciones, la expresión "aislado o recombinante" significa separado de los constituyentes, de forma celular y de otro modo, en donde la célula, el tejido, el polinucleótido, el péptido, el polipéptido, la proteína, el anticuerpo o fragmento(s) de los mismos, que normalmente están asociados en la naturaleza. Por ejemplo, una célula aislada es una célula que está separada del tejido o de células con un fenotipo o genotipo diferente. Un polinucleótido aislado está separado de nucleótidos contiguos en 3' y 5' con los que está normalmente asociado en su entorno originario o natural, por ejemplo, en el cromosoma. Como es evidente para los expertos en la técnica, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento(s) de los mismos con origen no natural, no requiere un "aislamiento", para distinguirlo de su homólogo que se produce de forma natural.

Una región de polinucleótido o polinucleótido (o un polipéptido o región de polipéptido) que tiene un cierto porcentaje (por ejemplo, 80%, 85%, 90% o 95%) de "identidad de secuencia" con otra secuencia, significa que cuando se alinea, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) es el mismo que al comparar las dos secuencias. La alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar usando programas informáticos conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., compiladores, 1987) Suplemento 30, Sección 7.7.18, Tabla 7.7.1. Preferiblemente, se emplean parámetros por defecto para la alineación. Un programa de alineación preferido es BLAST, que emplea parámetros por defecto. En particular, los programas preferidos son BLASTN y BLASTP, que emplean los siguientes parámetros por defecto: código genético = estándar; filtro = ninguno; hebra = ambas; punto de corte = 60; esperado = 10; Matrix = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenado por = HIGH SCORE; Bases de datos = no redundante, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traducciones de CDS de GenBank + SwissProtein + Spupdate + PIR. Detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente dirección de Internet: [ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST](http://ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST).

Se ha de concluir sin una indicación explícita y a menos que se pretenda de otro modo, que cuando la presente invención se refiere a un polipéptido, una proteína, un polinucleótido o un anticuerpo, se entiende que un equivalente o un equivalente biológico de los mismos está dentro del alcance de esta invención. Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión "equivalente biológico de los mismos" se entiende que es un sinónimo de "equivalente de los mismos" cuando se refiere a una proteína, un anticuerpo, un fragmento, un polipéptido o un ácido nucleico de referencia, se entienden aquellos que tienen una homología mínima a la vez que todavía conservan la estructura o funcionalidad deseadas. A menos que se indique específicamente en esta memoria, se contempla que cualquier polinucleótido, polipéptido o proteína mencionada en esta memoria, también incluye sus equivalentes. En un aspecto, un polinucleótido equivalente es uno que se hibrida en condiciones rigurosas con el polinucleótido o un complemento del polinucleótido como se describe en esta memoria, para uso en los métodos descritos. En otro aspecto, un anticuerpo equivalente o un polipéptido que se une a antígeno se entiende que es uno que se une con al menos 70% o alternativamente al menos 75% o alternativamente al menos 80% o alternativamente al menos 85% o alternativamente al menos 90% o alternativamente al menos 95% de afinidad o una afinidad mayor con un anticuerpo de referencia o un fragmento

que se une a antígeno. En otro aspecto, su equivalente compite en la unión del anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno, con su antígeno un ensayo ELISA de competencia. En otro aspecto, un equivalente se entiende que tiene al menos aproximadamente 80% de homología o identidad y, alternativamente, al menos aproximadamente un porcentaje de 85%, o alternativamente al menos 90%, o alternativamente al menos aproximadamente 95%, o alternativamente 98% de homología o identidad y muestra sustancialmente una actividad biológica equivalente a la de la proteína, polipéptido o ácido nucleico de referencia.

"Hibridación" se refiere a una reacción en la que uno o varios polinucleótidos reaccionan para formar un complejo que se estabiliza a través de enlaces de hidrógeno entre las bases de los residuos de nucleótidos. El enlace de hidrógeno se puede producir mediante apareamiento de bases de Watson-Crick, unión Hoogsteen o cualquier otra forma específica de secuencia. El complejo puede comprender dos hebras que forman una estructura dúplex, tres o más hebras que forman un complejo multihebras, una sola hebra autohibridada o cualquier combinación de las mismas. Una reacción de hibridación puede constituir una etapa de un proceso más extenso, como el inicio de una reacción PCR o la escisión enzimática de un polinucleótido con una ribozima.

Ejemplos de condiciones de hibridación rigurosas incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C; concentraciones de tampón de hibridación de aproximadamente 6x SSC a aproximadamente 10x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 0% a aproximadamente 25%; y soluciones de lavado desde aproximadamente 4x SSC a aproximadamente 8x SSC. Ejemplos de condiciones de hibridación moderadas incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 40°C a aproximadamente 50°C; concentraciones de tampón de aproximadamente 9x SSC a aproximadamente 2x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 30% a aproximadamente 50%; y soluciones de lavado de aproximadamente 5x SSC a aproximadamente 2x SSC. Ejemplos de condiciones muy rigurosas incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 55°C a aproximadamente 68°C; concentraciones de tampón de aproximadamente 1x SSC a aproximadamente 0,1x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 55% a aproximadamente 75%; y soluciones de lavado de aproximadamente de 1x SSC, 0,1x SSC o agua desionizada. En general, los tiempos de incubación de la hibridación son de 5 minutos a 24 horas, con 1, 2 o más etapas de lavado y los tiempos de incubación del lavado son de aproximadamente 1, 2 o 15 minutos. SSC es tampón NaCl 0,15 M y citrato 15 mM. Se entiende que se pueden emplear equivalentes de SSC utilizando otros sistemas de tampón.

"Homología" o "identidad" o "similitud" se refiere a la similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. La homología se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear para fines de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. Un grado de homología entre secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las secuencias. Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte una identidad de menos del 40% o alternativamente una identidad de menos del 25%, con una de las secuencias de la presente invención.

"Homología" o "identidad" o "similitud" también se puede referir a dos moléculas de ácido nucleico que se hibridan en condiciones rigurosas.

Tal y como se usa en esta memoria, los términos "tratar", "tratamiento" y similares se usan en esta memoria con el significado de obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. En un aspecto, el tratamiento indica una reducción de los signos de la enfermedad usando una escala establecida.

Tal y como se usa en esta memoria, con la expresión "trastorno relacionado con la esclerosis múltiple" se entiende un trastorno que está presente junto con una susceptibilidad a la EM o con EM. Ejemplos no limitantes de ellos incluyen neuromielitis óptica (NMO), uveítis, dolor neuropático, aterosclerosis, arteriosclerosis, esclerosis sistémica diseminada, EM espino-óptica, EM primaria progresiva (PPEM) y EM remitente recurrente (EMRR), esclerosis sistémica progresiva y esclerosis atáxica,

IGRP, que está codificada por un gen (localizado en el cromosoma 2q28-32 que solapa un locus de susceptibilidad a T1D, IDDM7 (2q31)), también se ha identificado recientemente como un autoantígeno de células beta de relevancia potencial en la T1D humana. Dos epítomos que se unen al HLA-A\*0201 de IGRP humana (hIGRP<sub>228-236</sub> y hIGRP<sub>265-273</sub>) son reconocidos por células CD8+ asociadas a los islotes procedentes de ratones NOD con una deficiencia en el MHC murino de clase I que expresan un transgén HLA-A\*0201. IGRP<sub>206-214</sub> comprende el péptido antigénico VYLKTNVFL (SEQ ID NO: 19).

Prevenir se entiende que es evitar un trastorno o un efecto *in vitro* o *in vivo* en un sistema o un sujeto que está predispuesto a la enfermedad o el efecto.

Una "composición" se entiende que significa una combinación de agente activo y otro compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente detectable o un marcador) o activo, tal como un adyuvante. En ciertas realizaciones, la composición no contiene un adyuvante.

Una "composición farmacéutica" se entiende que incluye la combinación de un agente activo con un vehículo, inerte o activo, haciendo que la composición sea adecuada para un uso diagnóstico o terapéutico *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

La expresión "codón funcionalmente equivalente" se utiliza en esta memoria para referirse a codones que codifican el mismo aminoácido, tal como los seis codones para arginina o serina y también se refiere a los codones que codifican aminoácidos biológicamente equivalentes (véase la Tabla siguiente).

Tabla de codones

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

5

Tal y como se usa en esta memoria, una "proteína" o un "polipéptido" o un "péptido" se refiere a una molécula que comprende al menos cinco residuos de aminoácidos.

### Descripción de las realizaciones

10 Esta descripción se basa en el descubrimiento de que nanopartículas acopladas a complejos de antígeno relevante para EM-MHC reducen los síntomas de la EM o la esclerosis múltiple (EAE) (Ejemplo 1).

### II. MÉTODOS

15 Los métodos tal y como se describen en esta memoria comprenden o alternativamente consisten esencialmente o consisten además también en la administración de una cantidad eficaz de un complejo de antígeno-MHC-nanopartícula a una célula, tejido o sujeto con el fin de: (1) ampliar y/o desarrollar poblaciones de linfocitos T autorreactivas antipatógenas (o anti-EM); y/o (2) tratar o prevenir la esclerosis múltiple o un trastorno relacionado con la esclerosis

múltiple en un paciente con esclerosis múltiple o un trastorno relacionado con la esclerosis múltiple o en un paciente susceptible de esclerosis múltiple o un trastorno relacionado con la esclerosis múltiple, en un aspecto sin comprometer la inmunidad sistémica. El antígeno usado en el complejo es un antígeno relacionado con la esclerosis múltiple. Los métodos para determinar y supervisar la terapia son conocidos en la técnica y se describen brevemente en esta memoria. Cuando se entrega *in vitro*, la administración es mediante la puesta en contacto de la composición con el tejido o la célula a través de cualquier método apropiado, por ejemplo, mediante la administración a una célula o un tejido de un medio de cultivo y es útil como un escrutinio para determinar si la terapia es apropiada para un individuo o para escrutar terapias alternativas que se pueden utilizar como sustituto o en combinación con las composiciones descritas. Cuando se administra *in vivo*, la administración es mediante administración sistémica o local. *In vivo*, los métodos se pueden poner en práctica en un animal no humano para escrutar terapias alternativas para ser utilizadas como un sustituto o en combinación con las composiciones descritas, antes de la administración a seres humanos. En un marífero humano o no humano también son útiles para tratar la enfermedad o el trastorno.

Los métodos requieren la administración de una cantidad eficaz de un complejo que comprende, consiste esencialmente o que consiste además también en, una nanopartícula; una proteína del MHC; y un antígeno relacionado con la esclerosis múltiple.

El MHC del complejo de antígeno-MHC-nanopartícula puede ser MHC I, MHC II o MHC no clásico. Las proteínas del MHC se describen en esta memoria. En una realización, el MHC del complejo de antígeno-MHC-nanopartícula es un MHC de clase I. En otra realización, el MHC es un MHC de clase II. En otras realizaciones, el componente del MHC del complejo de antígeno-MHC-nanopartícula es MHC de clase II o una molécula del MHC no clásico, como se describe en esta memoria. En un aspecto, el antígeno comprende o de forma alternativa consiste esencialmente o consiste además también en el polipéptido GWVRSFSPRVVH (SEQ ID NO: 1) o un equivalente de SEQ ID NO: 1. Antígenos adicionales que se pueden utilizar en esta invención comprenden polipéptidos que comprenden o alternativamente consisten esencialmente o que consisten además también en los polipéptidos del grupo: MOG<sub>35-55</sub>, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK (SEQ ID NO: 4); MOG<sub>36-55</sub>, EVGWYRSPFSRVVHLYRNGK (SEQ ID NO: 5); MAG<sub>287-295</sub>, SLLLEEEV (SEQ ID NO: 6); MAG<sub>509-517</sub>, LMWAKIGPV (SEQ ID NO: 7); MAG<sub>556-564</sub>, VLFSSDFRI (SEQ ID NO: 8); MBP<sub>110-118</sub>, SLSRFSWGA (SEQ ID NO: 9); MOG<sub>114-122</sub>, KVEDPFYVW (SEQ ID NO: 10); MOG<sub>166-175</sub>, RTFDPHFRLV (SEQ ID NO: 11); MOG<sub>172-180</sub>, FLRVPCWKI (SEQ ID NO: 12); MOG<sub>179-188</sub>, KITLFVIVPV (SEQ ID NO: 13); MOG<sub>188-196</sub>, VLGPLVALI (SEQ ID NO: 14); MOG<sub>181-189</sub>, TLFVIVPVL (SEQ ID NO: 15); MOG<sub>205-214</sub>, RLAGQFLEEL (SEQ ID NO: 16); PLP<sub>80-88</sub>, FLYGALLA (SEQ ID NO: 17), o un equivalente de cada uno de los mismos o combinaciones de los mismos.

El tamaño de la nanopartícula puede variar desde aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1  $\mu$ m. En ciertas realizaciones, la nanopartícula es menor de aproximadamente 1  $\mu$ m de diámetro. En otras realizaciones, la nanopartícula es menor de aproximadamente 500 nm, menor de aproximadamente 400 nm, menor de aproximadamente 300 nm, menor de aproximadamente 200 nm, menor de aproximadamente 100 nm o menor de aproximadamente 50 nm de diámetro. En realizaciones adicionales, la nanopartícula es desde aproximadamente 1 nm a aproximadamente 10 nm, 15 nm, 20 nm, 25 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 75 nm o 100 nm de diámetro. En realizaciones específicas, la nanopartícula es desde aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 50 nm, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 20 nm o de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 20 nm.

El tamaño del complejo puede variar desde aproximadamente 5 nm a aproximadamente 1  $\mu$ m. En ciertas realizaciones, el complejo es menor de aproximadamente 1  $\mu$ m o alternativamente menor de 100 nm de diámetro. En otras realizaciones, el complejo es menor de aproximadamente 500 nm, menor de aproximadamente 400 nm, menor de aproximadamente 300 nm, menor de aproximadamente 200 nm, menor de aproximadamente 100 nm o menor de aproximadamente 50 nm de diámetro. En realizaciones adicionales, el complejo es de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 50 nm o de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 75 nm o de aproximadamente 25 nm a aproximadamente 60 nm o de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 60 nm o, en un aspecto, aproximadamente 55 nm.

El solicitante ha descubierto que la densidad de los complejos de antígeno-MHC sobre la nanopartícula contribuye al beneficio terapéutico. Por lo tanto, como se describe en esta memoria, el complejo de antígeno-MHC-nanopartícula puede tener una densidad definida en el intervalo de aproximadamente 0,05 moléculas de MHC por 100 nm<sup>2</sup> de área de superficie de la nanopartícula, asumiendo al menos 2 MHCs o alternativamente al menos 8 o alternativamente al menos 9 o alternativamente al menos 10 o alternativamente al menos 11 o alternativamente al menos 12 MHCs formando un complejo con la nanopartícula. En un aspecto el complejo tiene una densidad de MHC de aproximadamente 0,01 MHC por 100 nm<sup>2</sup> (0,05 MHC/100 nm<sup>2</sup>) a aproximadamente 30 MHC/100 nm<sup>2</sup> o de forma alternativa de 0,1 MHC/100 nm<sup>2</sup> a aproximadamente 25 MHC/100 nm<sup>2</sup> o alternativamente de aproximadamente 0,3 MHC/100 nm<sup>2</sup> a aproximadamente 25 MHC/100 nm<sup>2</sup> o alternativamente de aproximadamente 0,4 MHC/100 nm<sup>2</sup> a aproximadamente 25 MHC/100 nm<sup>2</sup> o alternativamente de aproximadamente 0,5 MHC/100 nm<sup>2</sup> a aproximadamente 20 MHC/100 nm<sup>2</sup> o alternativamente de aproximadamente, o alternativamente de 0,6 MHC/100 nm<sup>2</sup> a aproximadamente 20 MHC/100 nm<sup>2</sup> o alternativamente de aproximadamente 1,0 MHC/100 nm<sup>2</sup> a aproximadamente 20 MHC/100 nm<sup>2</sup> o alternativamente de aproximadamente 5,0 MHC/100 nm<sup>2</sup> a aproximadamente 20 MHC/100 nm<sup>2</sup>, o alternativamente de aproximadamente 10,0 MHC/100 nm<sup>2</sup> a aproximadamente 20 MHC/100 nm<sup>2</sup> o alternativamente de aproximadamente 15 MHC/100 nm<sup>2</sup> a aproximadamente 20 MHC/100 nm<sup>2</sup> o alternativamente al menos aproximadamente 0,5 o alternativamente al menos aproximadamente 1,0 o alternativamente al menos aproximadamente 5,0 o alternativamente al menos aproximadamente 10,0 o alternativamente al menos aproximadamente 15,0 MHC/100 nm<sup>2</sup>. En un aspecto, cuando 9 o al menos 9 MHCs forman un complejo con una nanopartícula, el intervalo de densidad es de aproximadamente 0,3

MHC/100 nm<sup>2</sup> a aproximadamente 20 MHC/100 nm<sup>2</sup>.

En uno de los aspectos del método, se proporciona un método para la acumulación de linfocitos T antiinflamatorios en un paciente que lo requiere. En una realización adicional, el linfocito T es un linfocito T CD4+ o CD8+. En una realización relacionada, el linfocito T secreta IL-10 o TGFβ. El método comprende, consiste esencialmente o consiste además también en administrar a un paciente que lo requiere una cantidad eficaz del complejo de nanopartículas con antígeno-MHC como se describe en esta memoria.

En una realización, los métodos descritos en esta memoria son para el tratamiento de un trastorno relacionado con la esclerosis múltiple. El método comprende, consiste esencialmente o consiste además también en administrar a un paciente que lo requiere una cantidad eficaz del complejo de nanopartículas con antígeno-MHC como se describe en esta memoria. En una realización relacionada, el trastorno relacionado con la esclerosis múltiple se selecciona a partir del grupo que consiste en neuromielitis óptica (NMO), uveítis y dolor neuropático.

A continuación se describen detalles relativos a los modos de administración *in vitro* e *in vivo*.

### III. Complejos de antígeno-MHC-nanopartícula

Ciertos aspectos se refieren a procedimientos para la producción de medicamentos específicos de antígeno de la EM que tratan específicamente la EM sin comprometer la inmunidad sistémica. El Ejemplo 2 describe la producción de complejos de antígeno-MHC-nanopartícula. Los complejos de antígeno-MHC-nanopartícula útiles en esta invención comprenden un antígeno relevante para la EM.

#### A. Polipéptidos y polinucleótidos

Otros aspectos se refieren a un polipéptido aislado o purificado que comprende o que consiste esencialmente o que consiste además también en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia o alternativamente al menos 85% o alternativamente al menos 90% o alternativamente al menos 95% o alternativamente al menos 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 o un polipéptido codificado por polinucleótidos que tienen al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia o alternativamente al menos 85% o alternativamente al menos 90% o alternativamente al menos 95% o alternativamente al menos 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 o su complemento, o un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de moderadas a muy rigurosas con un polinucleótido que codifica SEQ ID NO: 1 o su complemento. También se proporcionan polinucleótidos aislados y purificados que codifican el polipéptido correspondiente a SEQ ID NO: 1, con al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, o alternativamente al menos 85% o alternativamente al menos 90% o alternativamente al menos 95% o alternativamente al menos 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 o un equivalente, o un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con el polinucleótido, su equivalente o su complemento y polipéptidos aislados o purificados codificados por esos polinucleótidos. Los polipéptidos y polinucleótidos se pueden combinar con sustancias de origen no natural con las que no están asociados en la naturaleza, por ejemplo, vehículos, vehículos farmacéuticamente aceptables, vectores y moléculas del MHC, nanopartículas como se conocen en la técnica y como se describen en esta memoria.

Los antígenos, incluidos segmentos, fragmentos y otras moléculas obtenidas a partir de una especie antigénica, incluyendo pero que no se limitan a péptidos, carbohidratos, lípidos u otras moléculas presentados por moléculas del MHC clásicas y no clásicas de la invención, normalmente forman complejos o se acoplan funcionalmente con una molécula del MHC o un derivado de la misma. El reconocimiento del antígeno por los linfocitos T está restringido al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés "major histocompatibility complex"). Un linfocito T dado reconocerá un antígeno solo cuando se une a una molécula particular del MHC. En general, los linfocitos T se estimulan solamente en presencia de moléculas del MHC propias y el antígeno es reconocido como fragmentos del antígeno unidos a moléculas propias del MHC. La restricción del MHC define la especificidad de los linfocitos T en términos del antígeno reconocido y en términos de la molécula del MHC que se une a su o sus fragmentos antigénicos. En aspectos particulares, ciertos antígenos se aparearán con ciertas moléculas del MHC o polipéptidos obtenidos a partir de las mismas.

La expresión "acoplado funcionalmente" o "recubierto" tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a una situación en la que un polipéptido individual (por ejemplo, el MHC) y componentes antigénicos (por ejemplo, un péptido) se combinan para formar el complejo activo antes de la unión al sitio diana, por ejemplo, una célula inmune. Esto incluye la situación en la que los componentes individuales polipeptídicos del complejo se sintetizan o se expresan de forma recombinante y posteriormente se aíslan y se combinan para formar un complejo, *in vitro*, antes de la administración a un sujeto; la situación en la que se sintetiza un polipéptido quimérico o de fusión (es decir, cada componente proteico discreto del complejo está contenido en una única cadena de polipéptido) o se expresa de forma recombinante como un complejo intacto. Típicamente, los complejos de polipéptido se añaden a las nanopartículas para producir nanopartículas con complejos de polipéptido adsorbidos o acoplados que tienen una relación entre el número de moléculas:número de nanopartículas desde aproximadamente, al menos aproximadamente o como máximo aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 o más a:1, más normalmente 0,1:1, 1:1 a 50:1 o 300:1. El contenido en polipéptido de las nanopartículas se puede determinar usando técnicas convencionales.

## B. Moléculas del MHC

Los antígenos intracelulares y extracelulares presentan desafíos muy distintos para el sistema inmune, tanto en términos de reconocimiento como de respuesta adecuada. La presentación de antígenos a los linfocitos T está mediada por dos clases distintas de moléculas, el MHC de clase I (MHC-I) y el MHC de clase II (MHC-II) (también identificado como "pMHC" en esta memoria), que utilizan distintas vías para el procesamiento de antígenos. Los péptidos obtenidos a partir de antígenos intracelulares se presentan a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> a través de las moléculas del MHC de clase I, que se expresan en prácticamente todas las células, mientras que los péptidos obtenidos a partir de antígenos extracelulares se presentan a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> a través de las moléculas del MHC-II. Sin embargo, hay ciertas excepciones a esta dicotomía. Varios estudios han mostrado que péptidos generados a partir de proteínas en partículas sometidas a endocitosis o solubles, se presentan sobre moléculas del MHC-I en macrófagos, así como en células dendríticas. En ciertas realizaciones de la invención, un antígeno particular se identifica y se presenta en el complejo de antígeno-MHC-nanopartícula en el contexto de un polipéptido de MHC de clase I o II apropiado. En ciertos aspectos, la composición genética de un sujeto se puede evaluar para determinar qué polipéptido del MHC se va a utilizar para un paciente particular y un conjunto particular de péptidos. En ciertas realizaciones, el componente del MHC clase I comprende toda o parte de una molécula del HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G o CD-1. En realizaciones en las que el componente del MHC es un componente del MHC de clase II, el componente del MHC de clase II puede comprender todo o parte de un HLA-DR, HLA-DQ o HLA-DP.

También se contemplan moléculas no clásicas del MHC para uso en complejos del MHC de la invención. Las moléculas no clásicas del MHC no son polimórficas, se conservan entre especies y poseen bolsillos de unión a ligando estrechos, profundos e hidrófobos. Estos bolsillos de unión son capaces de presentar glicolípidos y fosfolípidos a linfocitos T citolíticos naturales (NKT) o a ciertos subconjuntos de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, tales como linfocitos T CD8<sup>+</sup> Qa1 o restringidos a HLA-E. Los linfocitos NKT representan una población única de linfocitos que coexpresan marcadores de linfocitos NK y un receptor de linfocito T semi-invariante (TCR). Están implicados en la regulación de las respuestas inmunes asociadas con una amplia gama de enfermedades.

## C. Componentes antigénicos

Ciertos aspectos de la invención incluyen métodos y composiciones referentes a composiciones antigénicas que incluyen segmentos, fragmentos o epítopos de polipéptidos, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y otras moléculas que provocan o inducen una respuesta antigénica, generalmente denominadas antígenos. En particular, los segmentos o fragmentos antigénicos de determinantes antigénicos que conducen a la destrucción de una célula a través de una respuesta autoinmune, se pueden identificar y emplear en la preparación de un complejo de antígeno-MHC-nanopartícula descrito en esta memoria. Las realizaciones de la invención incluyen composiciones y métodos para la modulación de una respuesta inmune en una célula o tejido del organismo.

Los polipéptidos y péptidos de la invención se pueden modificar mediante diversas deleciones, inserciones y/o sustituciones de aminoácidos. En realizaciones particulares, polipéptidos y/o péptidos modificados son capaces de modular una respuesta inmune en un sujeto. En algunas realizaciones, se emplea una versión de tipo silvestre de una proteína o péptido, sin embargo, en muchas realizaciones de la invención, se emplea una proteína o un polipéptido modificado para generar un complejo de antígeno-MHC-nanopartícula. Un complejo de antígeno-MHC-nanopartícula se puede utilizar para generar una respuesta inmune antiinflamatoria, para modificar la población de linfocitos T del sistema inmune (es decir, reeducar el sistema inmune) y/o promover el reclutamiento y la acumulación de linfocitos T antiinflamatorios en un tejido particular. Los términos que se han descrito anteriormente se pueden usar de manera intercambiable en la presente memoria. Una "proteína modificada" o un "polipéptido modificado" o un "péptido modificado" se refiere a una proteína o un polipéptido cuya estructura química, en particular su secuencia de aminoácidos, se altera con respecto a la proteína o el polipéptido de tipo silvestre. En algunas realizaciones, una proteína o un polipéptido o un péptido modificado tiene al menos una actividad o función modificada (reconociendo que las proteínas o los polipéptidos o los péptidos pueden tener múltiples actividades o funciones). Se contempla específicamente que una proteína o polipéptido o péptido modificado se puede alterar con respecto a una actividad o función que todavía conserva una actividad o función de tipo silvestre en otros aspectos, tales como la inmunogenicidad o la capacidad de interactuar con otras células del sistema inmune en el contexto de un complejo de MHC-nanopartícula.

Los antígenos de la invención incluyen antígenos relacionados con la esclerosis múltiple. Tales antígenos incluyen, por ejemplo, los descritos en el documento de solicitud de patente de EE.UU. n° 2012-0077686, y antígenos obtenidos a partir de la proteína básica de la mielina, la glicoproteína asociada a la mielina, la proteína de la mielina de oligodendrocitos, la proteína proteolípídica, la oligoproteína de la mielina de oligodendrocitos, la proteína básica de oligodendrocitos asociada con la mielina, la proteína específica de oligodendrocitos, las proteínas de choque térmico, las proteínas específicas de oligodendrocitos NOGO A, la glicoproteína Po, la proteína de la mielina periférica 22 y 2'3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa. En ciertas realizaciones, el antígeno se obtiene a partir de un antígeno que se obtiene de la glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG, por sus siglas en inglés). En una realización relacionada, el antígeno se corresponde con un péptido que tiene al menos 80% de identidad con un péptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 o un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de moderadamente rigurosas a muy rigurosas con un polinucleótido que codifica una secuencia de SEQ ID NO: 1 o uno que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia de SEQ ID NO: 1 o un complemento de la misma.

En algunas realizaciones, el tamaño de una proteína o un polipéptido (de tipo silvestre o modificado), incluyendo cualquier complejo de una proteína o un péptido de interés y, en particular una fusión de MHC-péptido, puede comprender, pero sin limitarse a 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 244, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500 moléculas de aminoácidos o más, incluyendo cualquier intervalo o valor derivable en el mismo o derivado del mismo. En ciertos aspectos, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos contiguos, incluyendo derivados de los mismos y fragmentos de un antígeno, tales como aquellas secuencias de aminoácidos dadas a conocer y a las que se hace referencia en esta memoria, se pueden utilizar como antígenos. Se contempla que los polipéptidos se pueden mutar mediante truncamiento, haciéndolos más cortos que su correspondiente forma de tipo silvestre, pero también se pueden alterar fusionando o conjugando una secuencia de proteína heteróloga con una función particular (por ejemplo, para la presentación como un complejo de proteína, para aumentar la inmunogenicidad, etc.).

Las composiciones proteínicas se pueden preparar mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica, incluyendo (i) la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos a través de técnicas de biología molecular convencionales, (ii) el aislamiento de compuestos proteínicos a partir de fuentes naturales o (iii) la síntesis química de materiales proteínicos. El nucleótido así como las secuencias de proteínas, polipéptidos y péptidos para diversos genes se han descrito previamente y se pueden encontrar en bases de datos informatizadas reconocidas. Una de esas bases de datos es la base de datos de GenBank y GenPept del National Center for Biotechnology Information (en internet en [ncbi.nlm.nih.gov/](http://ncbi.nlm.nih.gov/)). La totalidad o parte de las regiones codificantes de estos genes se puede amplificar y/o expresar utilizando las técnicas descritas en la presente memoria o como serían conocidas por los expertos en la técnica.

Las variantes de secuencia de aminoácidos de epítomos autoantigénicos y otros polipéptidos de estas composiciones, pueden ser variantes por sustitución, inserción o delección. Una modificación en un polipéptido de la invención puede afectar a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 18b, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 o más ácidos aminoácidos contiguos o no contiguos de un péptido o un polipéptido, en comparación con el tipo silvestre.

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

Las variantes por sustitución típicamente contienen el intercambio de un aminoácido por otro en uno o varios sitios dentro de la proteína, y se pueden diseñar para modular una o varias propiedades del polipéptido, con o sin pérdida de otras funciones o propiedades. Las sustituciones pueden ser conservadoras, es decir, se reemplaza un aminoácido por uno de forma y carga similares. Las sustituciones conservadoras son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina a serina; arginina a lisina; asparagina a glutamina o histidina; aspartato a glutamato; cisteína a serina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina; metionina a leucina o isoleucina; fenilalanina a tirosina, leucina o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina; tirosina a triptófano o fenilalanina; y valina a isoleucina o leucina. Alternativamente, las sustituciones pueden ser no conservadoras de tal

manera que se afecta a una función o actividad de un polipéptido o péptido, tal como la avidéz o la afinidad hacia un receptor o receptores celulares. Los cambios no conservadores típicamente implican la sustitución de un residuo por uno que sea químicamente distinto, tal como un aminoácido polar o cargado por un aminoácido no polar o no cargado, y viceversa.

- 5 Las proteínas de la invención pueden ser recombinantes o estar sintetizadas *in vitro*. Alternativamente, una proteína recombinante se puede aislar a partir de bacterias u otras células hospedadoras.

También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos pueden incluir residuos adicionales, tales como aminoácidos C-terminales o N-terminales adicionales o secuencias 5' o 3' de ácido nucleico, respectivamente y sin embargo todavía ser esencialmente como se exponen en una de las secuencias descritas en la presente memoria, siempre que la secuencia cumpla los criterios establecidos anteriormente, incluyendo el mantenimiento de la actividad de la proteína biológica (por ejemplo, la inmunogenicidad). La adición de secuencias terminales se aplica particularmente a secuencias de ácidos nucleicos que, por ejemplo, pueden incluir diversas secuencias no codificantes que flanquean cualquiera de las porciones 5' o 3' de la región codificante.

10 Se contempla que en las composiciones de la invención, hay entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 10 mg de proteína total por ml. Por lo tanto, la concentración de proteína en una composición puede ser de aproximadamente, al menos aproximadamente o como máximo aproximadamente 0,001, 0,010, 0,050, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 50, 100 µg/ml o mg/ml o más (o cualquier intervalo derivable en el mismo). De esta cantidad, aproximadamente, al menos aproximadamente o como máximo aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% puede ser el complejo de antígeno-MHC-nanopartícula.

La presente invención contempla la administración de un complejo de antígeno-MHC-nanopartícula para efectuar un tratamiento contra la EM y/o una inflamación asociada con la EM.

25 Además, el documento de patente de EE.UU. nº 4.554.101 (Hopp), describe la identificación y la preparación de epítopos a partir de secuencias de aminoácidos primarios basándose en la hidrofiliidad. A través de los métodos descritos por Hopp, un experto en la técnica sería capaz de identificar epítopos potenciales a partir de una secuencia de aminoácidos y confirmar su inmunogenicidad. Numerosas publicaciones científicas también se han dedicado a la predicción de la estructura secundaria y la identificación de epítopos, a partir de análisis de secuencias de aminoácidos (Chou & Fasman, *Adv. Enzymol.*, 47:45-148,1978; Chous y Fasman, *Annu. Rev. Biochem.*, 47:251-276,1978, Chou y Fasman, *Biochemistry*, 13(2):211-222, 1974; Chau y Fasman, *Biochemistry*, 13(2):222-245, 1974, Chou y Fasman, *Biophys. J.*, 26(3):385-399, 1979). Cualquiera de ellas se puede usar, si se desea, para complementar las descripciones de Hopp en la patente de EE.UU. nº 4.554.101.

30 Se pueden emplear moléculas distintas de los péptidos como antígenos o fragmentos antigénicos en un complejo con moléculas del MHC, tales moléculas incluyen, pero sin limitarse a hidratos de carbono, lípidos, moléculas pequeñas y similares. Los hidratos de carbono son componentes principales de la superficie exterior de una variedad de células. Ciertos hidratos de carbono son características de diferentes estadios de la diferenciación y muy a menudo esos hidratos de carbono son reconocidos por anticuerpos específicos. La expresión de distintos hidratos de carbono se puede restringir a tipos celulares específicos.

#### 40 D. Sustratos/nanopartículas

En cierto aspecto, los complejos de antígeno/MHC están acoplados funcionalmente a un sustrato, los cuales se puede unir covalentemente o no covalentemente al sustrato. Un sustrato puede estar en forma de nanopartícula que comprende opcionalmente un material biocompatible y/o bioabsorbible. Por consiguiente, en una realización, la nanopartícula es biocompatible y/o bioabsorbible. Un sustrato también puede estar en forma de nanopartícula, tal como las descritas previamente en el documento de publicación de patente de EE.UU. nº 2009/0155292, que en un aspecto no es un liposoma. Las nanopartículas pueden tener una estructura de dimensión variable y conocida diversamente como nanoesfera, una nanopartícula o una nanoesfera biodegradable biocompatible o una nanopartícula biodegradable biocompatible. Tales formulaciones en forma de partículas que contienen un complejo de antígeno/MHC pueden estar formadas mediante un acoplamiento covalente o no covalente del complejo con la nanopartícula.

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

55 Las capas también pueden impartir funcionalidades químicas o biológicas, denominadas en esta memoria como capas químicamente activas o biológicamente activas, y para esas funcionalidades la capa o las capas pueden variar normalmente en espesor desde aproximadamente 0,001 micrómetros (1 nanómetro) a aproximadamente 10 micrómetros o más (dependiendo del diámetro de nanopartícula deseado), estas capas normalmente se aplican sobre la superficie

exterior de la nanopartícula.

Las composiciones del núcleo y las capas pueden variar. Los materiales adecuados para las partículas o el núcleo incluyen, pero no se limitan a polímeros, cerámicas, vidrios, minerales y similares. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, vidrios convencionales y especiales, sílice, poliestireno, poliéster, policarbonato, polímeros acrílicos, poliacrilamida, poliacrilonitrilo, poliamida, fluoropolímeros, siliconas, celulosas, silicio, metales (por ejemplo, hierro, oro, plata), minerales (por ejemplo, rubí), nanopartículas (por ejemplo, nanopartículas de oro, partículas coloidales, óxidos metálicos, sulfuros metálicos, seleniuros metálicos y materiales magnéticos, tales como óxido de hierro) y combinaciones de los mismos. El núcleo podría ser de una composición homogénea o una combinación de dos o más clases de materiales en función de las propiedades deseadas. En ciertos aspectos, se utilizarán nanopartículas metálicas. Estas partículas o nanopartículas metálicas se pueden formar a partir de Au, Pt, Pd, Cu, Ag, Co, Fe, Ni, Mn, Sm, Nd, Pr, Gd, Ti, Zr, Si e In, precursores, sus aleaciones binarias, sus aleaciones ternarias y sus compuestos intermetálicos. Véase el documento de patente de EE.UU. nº 6.712.997. En ciertas realizaciones, las composiciones del núcleo y las capas pueden variar con la condición de que las nanopartículas sean biocompatibles y bioabsorbibles. El núcleo podría ser de una composición homogénea o una combinación de dos o más clases de materiales en función de las propiedades deseadas. En ciertos aspectos, se utilizarán nanoesferas de metal. Estas nanopartículas metálicas pueden formarse a partir de Fe, Ca, Ga y similares. En ciertas realizaciones, la nanopartícula comprende un núcleo que comprende metal u óxido de metal.

Como se ha mencionado anteriormente, la nanopartícula puede incluir además del núcleo, una o varias capas. La nanopartícula puede incluir una capa que consiste en un azúcar biodegradable u otro polímero. Ejemplos de capas biodegradables incluyen pero no se limitan a dextrano; polietilenglicol; poli(óxido de etileno); manitol; poliésteres basados en polilactida (PLA), poliglicólido (PGA), policaprolactona (PCL); polihidroxialcanoatos de la clase PHB-PHV; y otros polisacáridos modificados, tales como almidón, celulosa y quitosano. Además, la nanopartícula puede incluir una capa con superficies adecuadas para la fijación de funcionalidades químicas para sitios de unión o de acoplamiento químico.

Las capas se pueden producir sobre las nanopartículas en una variedad de formas conocidas por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen técnicas de química de sol-gel, como se describen en Iler, *Chemistry of Silica*, John Wiley & Sons, 1979; Brinker y Scherer, *Sol-gel Science*, Academic Press, (1990). Enfoques adicionales para la producción de capas sobre nanopartículas incluyen técnicas de química de superficies y de encapsulación tal como se describen en Partch y Brown, *J. Adhesion*, 67: 259-276, 1998; Pekarek et al., *Nature*, 367: 258, (1994); Hanprasopwattana, *Langmuir*, 12: 3173-3179, (1996); Davies, *Advanced Materials*, 10: 1264-1270, (1998); y referencias en las mismas. También se pueden emplear técnicas de deposición con vapor; véase, por ejemplo Golman y Shinohara, *Trends Chem. Engin.*, 6: 1-6, (2000); y el documento de patente de EE.UU. nº 6.387.498. Todavía otros enfoques incluyen técnicas de autoensamblaje capa por capa, como se describen en Sukhorukov et al., *Polymers Adv. Tech.*, 9(10-11): 759-767, (1998); Caruso et al., *Macromolecules*, 32(7): 2317-2328, (1998); Caruso et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 121(25): 6039-6046, (1999); el documento de patente de EE.UU. nº 6.103.379 y las referencias citadas en las mismas.

Las nanopartículas se pueden formar poniendo en contacto una fase acuosa que contiene el complejo de antígeno/MHC/molécula coestimuladora y un polímero y una fase no acuosa, seguido de evaporación de la fase no acuosa para provocar la coalescencia de partículas desde la fase acuosa, como se describe en el documento de patente de EE.UU. nº 4.589.330 o 4.818.542. Los polímeros preferidos para tales preparaciones son copolímeros o polímeros naturales o sintéticos, seleccionados a partir del grupo que consiste en agar de gelatina, almidón, arabinogalactano, albúmina, colágeno, poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), glicolida-L(-)lactida poli(epsilon-caprolactona, poli(epsilon-caprolactona-CO-ácido láctico), poli(epsilon-caprolactona-CO-ácido glicólico), poli(ácido beta-hidroxi butírico), poli(óxido de etileno), polietileno, poli(alquil-2-cianoacrilato), poli(metacrilato de hidroxietilo), poliamidas, poli(aminoácidos), poli(2-hidroxietil DL-aspartamida), poli(urea éster), poli(L-fenilalanina/etilenglicol/1,6-diiisocianatohexano) y poli(metacrilato de metilo). Los polímeros particularmente preferidos son poliésteres, tales como poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), glicolida-L(-)lactida poli(epsilon-caprolactona, poli(epsilon-caprolactona-CO-ácido láctico) y poli(epsilon-caprolactona-CO-ácido glicólico). Los disolventes útiles para disolver el polímero incluyen: agua, hexafluoroisopropanol, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, hexano, benceno o sesquihidrato de hexafluoroacetona.

El tamaño de la nanopartícula puede variar desde aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1 µm. En ciertas realizaciones, la nanopartícula es menor de aproximadamente 1 µm de diámetro. En otras realizaciones, la nanopartícula es menor de aproximadamente 500 nm, menor de aproximadamente 400 nm, menor de aproximadamente 300 nm, menor de aproximadamente 200 nm, menor de aproximadamente 100 nm o menor de aproximadamente 50 nm de diámetro. En realizaciones adicionales, la nanopartícula tiene un diámetro de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 10 nm, 15 nm, 20 nm, 25 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 75 nm o 100 nm. En realizaciones específicas, la nanopartícula es de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 50 nm, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 20 nm o de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 20 nm.

El tamaño del complejo puede variar de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 1 µm. En ciertas realizaciones, el complejo es menor de aproximadamente 1 µm o alternativamente menor de 100 nm de diámetro. En otras realizaciones, el complejo es menor de aproximadamente 500 nm, menor de aproximadamente 400 nm, menor de aproximadamente 300 nm, menor de aproximadamente 200 nm, menor de aproximadamente 100 nm o menor de

aproximadamente 50 nm de diámetro. En realizaciones adicionales, el complejo es de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 50 nm o de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 75 nm o de aproximadamente 25 nm a aproximadamente 60 nm o de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 60 nm, o en un aspecto aproximadamente 55 nm.

#### 5 E. Acoplamiento del complejo de antígeno-MHC con la nanopartícula

Con el fin de acoplar el sustrato o nanoesferas con los complejos de antígeno-MHC, se pueden aplicar las siguientes técnicas.

10 La unión se puede generar modificando químicamente el sustrato o la nanopartícula la que normalmente implica la generación de "grupos funcionales" en la superficie, siendo capaces dichos grupos funcionales de unirse a un complejo de antígeno-MHC, y/o uniendo la superficie opcionalmente modificada químicamente del sustrato o de la nanopartícula con las llamadas "moléculas de enlace" unidas covalentemente o no covalentemente, seguido de hacer reaccionar el complejo de antígeno-MHC con las nanopartículas obtenidas.

15 La expresión "molécula de enlace" significa una sustancia capaz de unirse con el sustrato o la nanopartícula y también capaz de unirse a un complejo de antígeno-MHC. En ciertas realizaciones, los complejos de antígeno-MHC se acoplan a la nanopartícula mediante un enlazador. Ejemplos no limitantes de enlazadores adecuados incluyen enlazadores de dopamina (DPA)-polietilenglicol (PEG), tales como éster de DPA-PEG-NHS éster, DPA-PEG-disulfuro de ortopiridilo (OPSS) y/o DPA-PEG-azida. Otros enlazadores incluyen enlazadores peptídicos, etilenglicol, biotina y estreptavidina.

20 La expresión "grupos funcionales" tal y como se ha empleado anteriormente en la presente memoria, no se limita a grupos químicos reactivos que forman enlaces covalentes, sino que también incluye grupos químicos que conducen a una interacción iónica o puentes de hidrógeno con el complejo de antígeno-MHC. Por otra parte, hay que señalar que una distinción estricta entre "grupos funcionales" generados en la superficie y moléculas de enlace que son portadoras de "grupos funcionales", no es posible, ya que a veces la modificación de la superficie requiere la reacción de moléculas de enlace más pequeñas, tales como etilenglicol, con la superficie de la nanoesfera.

25 Los grupos funcionales o las moléculas de enlace que los transportan se pueden seleccionar a partir de grupos amino, grupos de

30 ácido carbónico, tioles, tioéteres, disulfuros, guanidino, grupos hidroxilo, grupos amino, dioles vecinos, aldehídos, grupos alfa-haloacetilo, organilos de mercurio, grupos éster, haluro de ácido, tioéster de ácido, anhídrido de ácido, isocianatos, isotiocianatos, haluros de ácido sulfónico, imidóesteres, diazoacetatos, sales de diazonio, 1,2-dicetonas, ácidos fosfónicos, ésteres de ácido fosfórico, ácidos sulfónicos, azolidas, imidazoles, indoles, N-maleimidadas, compuestos de carbonilo insaturados en alfa-beta, arilhaluros o sus derivados.

35 Ejemplos no limitantes para otras moléculas de enlace con pesos moleculares más altos, son moléculas de ácidos nucleicos, polímeros, copolímeros, agentes de acoplamiento polimerizables, sílice, proteínas y moléculas tipo cadena que tienen una superficie con la polaridad opuesta con respecto al sustrato o la nanopartícula. Los ácidos nucleicos pueden proporcionar un enlace a moléculas de afinidad que contienen moléculas de ácido nucleico propias, aunque con una secuencia complementaria con respecto a la molécula de enlace.

Un ejemplo específico de un enlazador covalente incluye polietilenglicol (PEG). El enlazador PEG puede ser un enlazador tiol-PEG-NH<sub>2</sub>.

40 En ciertas realizaciones, el enlazador tal y como se describe en la presente memoria, tiene un tamaño definido. En algunas realizaciones, el enlazador es menor de aproximadamente 10 kD, menor de aproximadamente 5 kD, menor de aproximadamente 4,5 kD, menor de aproximadamente 4 kD, menor de aproximadamente 3,5 kD, menor de aproximadamente 3 kD, menor de aproximadamente 2,5 kD, menor de aproximadamente 2 kD o menor de aproximadamente 1 kD. En realizaciones adicionales, el enlazador tiene de aproximadamente 0,5 kD a aproximadamente 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5 o 1 kD. En aún otras realizaciones, el enlazador tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2 o 1,5 kD.

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

50 La superficie del sustrato o nanopartícula se puede modificar químicamente, por ejemplo, mediante la unión de derivados de ácido fosfónico que tienen grupos funcionales reactivos. Un ejemplo de esos derivados de ácido fosfónico o éster de ácido fosfónico es ácido imino-bis(metilenfosfono)carbónico que se puede sintetizar de acuerdo con la reacción "Mannich-Moedritzer". Esta reacción de unión se puede realizar con el sustrato o la nanoesfera tal y como se obtiene directamente a partir del procedimiento de preparación o después de un pretratamiento (por ejemplo con bromuro de trimetilsililo). En el primer caso, el derivado (éster) de ácido fosfónico, por ejemplo, puede desplazar los componentes del medio de reacción que todavía están unidos a la superficie. Este desplazamiento se puede mejorar a temperaturas más altas. El bromuro de trimetilsililo, por el contrario, se cree que desalquila los agentes que forman un complejo a base de fósforo que contienen un grupo alquilo, creando de este modo nuevos sitios de unión para el

55

derivado (éster) de ácido fosfónico. El derivado (éster) de ácido fosfónico o las moléculas de enlace unidas al mismo, pueden mostrar los mismos grupos funcionales que los que se han proporcionado anteriormente. Un ejemplo adicional del tratamiento de la superficie del sustrato o la nanoesfera implica el calentamiento en un diol tal como etilenglicol. Cabe señalar que este tratamiento puede ser redundante si la síntesis ya procedió en un diol. En esas circunstancias, el producto de la síntesis obtenido directamente es probable que muestre los grupos funcionales necesarios. Este tratamiento sin embargo es aplicable a un sustrato o a una nanopartícula que se había producido en agentes formadores de complejos que contenían N o P. Si un sustrato o partícula de ese tipo se somete a un tratamiento posterior con etilenglicol, los ingredientes del medio de reacción (por ejemplo, el agente formador de complejo) que todavía se unen a la superficie, se pueden reemplazar por el diol y/o se pueden desalquilar.

También es posible reemplazar los agentes que forman complejos que contienen N todavía unidos a la superficie de la partícula por derivados de aminas primarias que tienen un segundo grupo funcional. La superficie del sustrato o de la nanopartícula también se puede recubrir con sílice. La sílice permite una conjugación química relativamente simple de moléculas orgánicas ya que la sílice reacciona fácilmente con enlazadores orgánicos, tales como trietoxisilano o clorosilano. La superficie de las nanopartículas también se puede recubrir con homopolímeros o copolímeros. Ejemplos de agentes de acoplamiento polimerizables son N-(3-aminopropil)-3-mercaptobenzamidina, 3-(trimetoxisilil)propilhidrazida y 3-(trimetoxisilil)propilmaleimida. Otros ejemplos no limitantes de agentes de acoplamiento polimerizables se mencionan en esta memoria. Estos agentes de acoplamiento se pueden utilizar solos o en combinación dependiendo del tipo de copolímero que se va a generar como recubrimiento.

Otra técnica de modificación de la superficie que se puede usar con sustratos o nanopartículas que contienen compuestos de metales de transición de tipo óxido es la conversión de los compuestos de metales de transición de tipo óxido mediante gas cloro o agentes de cloración orgánicos, en los oxicluros correspondientes. Estos oxicluros son capaces de reaccionar con nucleófilos, tales como grupos hidroxilo o amino ya que se encuentran frecuentemente en las biomoléculas. Esta técnica permite la generación de una conjugación directa con proteínas, por ejemplo, a través del grupo amino de las cadenas laterales de lisina. La conjugación con proteínas después de la modificación de la superficie con oxicluros puede efectuarse también mediante el uso de un enlazador bifuncional, tal como hidrazida de ácido maleimidopropiónico.

Para las técnicas de unión no covalentes, las moléculas de tipo cadena que tienen una polaridad o carga opuesta a la de la superficie del sustrato o la nanoesfera, son particularmente adecuadas. Ejemplos de moléculas de enlace que pueden estar unidas covalentemente a nanoesferas del núcleo/recubrimiento, implican tensioactivos aniónicos, catiónicos o iónicos bipolares, proteínas ácidas o básicas, poliaminas, poliamidas, polisulfona o poli(ácido carboxílico). La interacción hidrófoba entre el sustrato o la nanoesfera y el reactivo anfifílico que tiene un grupo reactivo funcional, puede generar el enlace necesario. En particular, son útiles las moléculas de tipo cadena con carácter anfifílico, tales como fosfolípidos o polisacáridos derivatizados, que se pueden reticular entre sí. La absorción de esas moléculas sobre la superficie se puede lograr mediante coincubación. La unión entre la molécula de afinidad y el sustrato o la nanopartícula también se puede basar en enlaces no covalentes, autoorganizables. Un ejemplo de los mismos implica sondas de detección simples con biotina como molécula de enlace y moléculas acopladas con avidina o estreptavidina.

Protocolos para las reacciones de acoplamiento de grupos funcionales a moléculas biológicas se pueden encontrar en las publicaciones, por ejemplo en "Bioconjugate Techniques" (Greg T. Hermanson, Academic Press 1996). La molécula biológica (por ejemplo, una molécula del MHC o un derivado de la misma) se puede acoplar a la molécula de enlace, de forma covalente o no covalente, de conformidad con procedimientos convencionales de química orgánica, tales como oxidación, halogenación, alquilación, acilación, adición, sustitución o amidación. Estos métodos para el acoplamiento de la molécula de enlace unida covalentemente o no covalentemente se pueden aplicar antes del acoplamiento de la molécula de enlace al sustrato o a la nanoesfera, o después. Además, es posible, por medio de una incubación, efectuar una unión directa de las moléculas a un sustrato o una nanopartícula pretratada correspondientemente (por ejemplo, con bromuro de trimetilsililo), la cual muestra una superficie modificada debido a este pretratamiento (por ejemplo, una mayor carga o superficie polar).

#### F. Producción de proteínas

La presente invención describe polipéptidos, péptidos y proteínas para uso en diversas realizaciones de la presente invención. Por ejemplo, péptidos específicos y sus complejos se someten a ensayo en cuanto a sus capacidades para inducir o modular una respuesta inmune. En realizaciones específicas, la totalidad o parte de los péptidos o proteínas de la invención también se pueden sintetizar en solución o sobre un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Varios sintetizadores automáticos están disponibles comercialmente y se pueden utilizar de acuerdo con protocolos conocidos. Véanse, por ejemplo, Stewart y Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª. Ed, Pierce Chemical Co.1, (1984.); Tam et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 105: 6442, (1983); Merrifield, *Science*, 232 (4748): 341-347, (1986); y Barany y Merrifield, *The Peptides*, Gross y Meinhofer (compiladores), Academic Press, Nueva York, 1-284, (1979).

Alternativamente, la tecnología de ADN recombinante se puede emplear en la que una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de la invención se inserta en un vector de expresión, se transforma o se transfecta en una célula hospedadora apropiada y se cultiva en condiciones adecuadas para la expresión.

Una realización de la invención incluye el uso de la transferencia de genes a las células, incluyendo microorganismos,

para la producción de proteínas. El gen de la proteína de interés se puede transferir a células hospedadoras apropiadas seguido por un cultivo de las células en las condiciones apropiadas. Se puede emplear un ácido nucleico que codifica virtualmente cualquier polipéptido. La generación de vectores de expresión recombinantes y los elementos incluidos en los mismos, son conocidos por un experto en la técnica y se describen brevemente en esta memoria.

5 Ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero incluyen, pero no se limitan, a células Vero y HeLa, otras líneas de linfocitos B y T, tales como CEM, 721.221, H9, Jurkat, Raji, así como las líneas de células de ovario de hámster chino, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN y células MDCK. Adicionalmente, una cepa de células hospedadoras se puede seleccionar de forma que module la expresión de las secuencias insertadas o que modifique y procese el producto génico en la manera deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento

10 (por ejemplo, escisión) de productos proteicos puede ser importante para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y la modificación de proteínas. Las líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados se pueden elegir para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada.

Se puede emplear una variedad de sistemas de selección, incluyendo, pero no limitados a los genes de timidina cinasa de HSV, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y adenina fosforribosiltransferasa en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. También, una resistencia a antimetabolito se puede usar como base para la selección: para dhfr, que confiere resistencia a la trimetoprima y el metotrexato; gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico; neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G418; e hyg, que confiere resistencia a la higromicina.

#### G. Ácidos nucleicos

20 La presente invención puede incluir polinucleótidos recombinantes que codifican las proteínas, los polipéptidos, los péptidos de la invención, tales como, por ejemplo, SEQ ID NO: 1 o 2.

En realizaciones particulares, la invención se refiere a segmentos aislados de ácidos nucleicos y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ácidos nucleicos que codifican un autoantígeno y/o una molécula del MHC. El término "recombinante" se puede usar junto con un polipéptido o el nombre de un polipéptido específico y este se refiere en general a un polipéptido producido a partir de una molécula de ácido nucleico que ha sido manipulada *in vitro* o que es un producto de la replicación de esa molécula.

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

#### IV. Composiciones farmacéuticas y administración

En la presente memoria se proporcionan composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de una enfermedad.

##### 40 A. Composiciones farmacéuticas

Los complejos de nanopartículas y antígeno-MHC se pueden administrar solos o en combinación con un vehículo, tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable en una composición. Las composiciones de la invención se pueden administrar convencionalmente de forma parenteral, mediante inyección, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular. Formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales. Las formulaciones orales incluyen excipientes empleados normalmente tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones están en forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen de aproximadamente 10% a aproximadamente 95% de ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente 25% a aproximadamente 70%. La preparación de una composición acuosa que contiene un complejo de antígeno-MHC-nanopartícula que modifica el estado inmune del sujeto, es conocida por los expertos en la técnica de cara a la presente descripción. En ciertas realizaciones, una composición se puede inhalar (por ejemplo, documento de patente de EE.UU. nº 6.651.655). En una realización, el complejo de antígeno-MHC-nanopartícula se administra sistémicamente.

Típicamente, las composiciones de la invención se administran de una manera compatible con la formulación de la dosificación y en una cantidad tal como si fuera terapéuticamente eficaz e inmunomodificadora. La cantidad que se va a administrar depende del sujeto que se va a tratar. Las cantidades precisas de ingrediente activo requeridas para ser administradas dependen del juicio del médico. Sin embargo, unos intervalos de dosificación adecuados son del orden de diez a varios cientos de nanogramos o microgramos de complejo de antígeno-MHC-nanopartícula por

administración. Los regímenes adecuados para una administración inicial y para los refuerzos también son variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida de administraciones posteriores.

5 En muchos casos, será deseable tener múltiples administraciones de un complejo de péptido-MHC-nanopartícula, aproximadamente, a lo sumo aproximadamente o al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más. Las administraciones normalmente oscilarán entre 2 días a intervalos de doce semanas, más habitualmente a intervalos desde una semana a dos semanas. Refuerzos periódicos a intervalos de 0,5-5 años, por lo general dos años, pueden ser deseables para mantener el estado del sistema inmune. El curso de las administraciones puede venir seguido por ensayos de respuestas inmunes inflamatorias y/o actividad de los linfocitos T autorreguladores.

10 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto. Diferentes aspectos de la presente invención implican la administración de una cantidad eficaz de una composición de complejo de antígeno-MHC-nanopartícula a un sujeto. Adicionalmente, tales composiciones se pueden administrar en combinación con modificadores del sistema inmune. Tales composiciones generalmente se disuelven o dispersan en un vehículo farmacéuticamente aceptable o en medio acuoso.

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

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

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

30 El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede facilitar con varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Una absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede facilitar mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

35 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización. La esterilización de la solución se realizará de manera que no se reduzcan las propiedades terapéuticas del complejo de antígeno-MHC-nanopartícula. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los mencionados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo, más cualquier ingrediente adicional deseado procedente de una solución previamente esterilizada del mismo. Un método de esterilización de la solución de este tipo es la filtración estéril, sin embargo, se entiende que esta invención incluye cualquier método de esterilización que no disminuya significativamente las propiedades terapéuticas de los complejos de antígeno-MHC-nanopartícula. Los métodos de esterilización que implican un calor y presión intensos, tales como la esterilización en autoclave, pueden afectar a la estructura terciaria del complejo, disminuyendo de este modo significativamente las propiedades terapéuticas de los complejos de antígeno-MHC-nanopartícula.

55 Una cantidad eficaz de la composición terapéutica se determina basándose en el objetivo previsto. La expresión "dosis unitaria" o "dosificación" se refiere a unidades físicamente discretas, adecuadas para uso en un sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de la composición calculada para producir las respuestas deseadas descritas anteriormente, en asociación con su administración, es decir, la vía y el régimen apropiados. La cantidad que se

va a administrar, tanto de acuerdo con el número de tratamientos y de la dosis unitaria, depende del resultado y/o la protección deseados. Las cantidades precisas de la composición también dependen del juicio del médico y son peculiares para cada individuo. Los factores que afectan a la dosis incluyen el estado físico y clínico del sujeto, la vía de administración, el objetivo pretendido del tratamiento (alivio de síntomas frente a curación) y la potencia, la estabilidad y la toxicidad de la composición particular. Después de la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de la dosificación y en una cantidad tal que sea eficaz de forma terapéutica o profiláctica. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente.

B. Terapia de combinación

Las composiciones y los métodos relacionados de la presente invención, en particular la administración de un complejo de antígeno-MHC-nanopartícula, también se pueden utilizar en combinación con la administración de terapias tradicionales. Estas incluyen, pero no se limitan a, Avonex (interferón beta-1a), Betaseron (interferón beta-1b), Copaxone (acetato de glatiramer), Novantrone (mitoxantrona), Rebif (interferón beta-1a), Tysabri (natalizumab), Gilenya (fingolimod), Glatiramer, esteroides, Cytoxan, Imuran, Baclofen, estimulación profunda del cerebro, Ampyra (dalfampridina), acupuntura y terapia física.

Cuando se emplea una terapia de combinación, se pueden emplear diversas combinaciones, por ejemplo, la administración de un complejo de antígeno-MHC-nanopartícula es "A" y el agente adicional es "B":

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

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

C. Administración *in vitro* o *ex vivo*

Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión administración *in vitro* se refiere a las manipulaciones realizadas en células extraídas de un sujeto o de fuera de éste, incluyendo, pero sin limitarse a células en cultivo. La expresión administración *ex vivo* se refiere a células que se han manipulado *in vitro* y se administran posteriormente a un sujeto. La expresión administración *in vivo* incluye todas las manipulaciones realizadas dentro de un sujeto, incluidas las administraciones.

En ciertos aspectos de la presente invención, las composiciones se pueden administrar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En ciertas realizaciones *in vitro*, se incuban linfocitos T autólogos con composiciones de esta invención. Las células o el tejido se pueden utilizar después para un análisis *in vitro*, o, alternativamente, para la administración *ex vivo*.

V. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de ilustrar diversas realizaciones de la invención y no están destinados a limitar la presente invención de ninguna manera. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como los objetos, fines y ventajas inherentes a la presente memoria. Los presentes ejemplos, junto con los métodos descritos en esta memoria son actualmente representativos de las realizaciones y son ejemplares y no pretenden ser limitaciones del alcance de la invención.

Ejemplo 1

pMHC de clase II-NPs en un modelo de enfermedad autoinmune EAE crónica.

Este ejemplo describe el uso de nanopartículas recubiertas con complejos de antígeno relacionados con la EM-MHC para tratar la EAE en un modelo de ratón con EAE. Este nuevo enfoque terapéutico se puede utilizar para la administración sistémica de nanopartículas recubiertas con complejos individuales de péptido relevante para la EM-MHC (pMHC) (es decir, un complejo de pMHC por enfermedad). Este descubrimiento permite un diseño racional de 'nanovacunas' específicas de una enfermedad, capaces de amortiguar la autoinmunidad, sin perjudicar la inmunidad sistémica, un objetivo buscado desde hace tiempo en la terapia de esos trastornos. La FIG. 1 muestra que las nanovacunas mono-específicas, recubiertas con pMHC de clase II relevante para la EM, pueden revertir la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) establecida en ambos ratones C57BL/6. Este enfoque también es aplicable a los complejos de pMHC humanos conocidos por ser la diana de los linfocitos T CD4+ autorreactivos en pacientes con EM. Una demostración de la eficacia clínica en esos modelos preclínicos allanará el camino para ensayos clínicos en seres humanos y, potencialmente, el desarrollo de una curación de la EM.

La EAE requiere la generación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> autorreactivos junto con la ruptura de la barrera hematoencefálica, lo que permite el reclutamiento de células encefalitogénicas al SNC. La inmunización de ratones C57BL/6 (B6) con pMOG<sub>36-55</sub> (200 µg) en CFA complementado con 10 µg/ml de Mycobacterium tuberculosis s.c. (en la base de la cola) junto con 300 ng de toxina pertussis i.p., seguido de otra dosis de la toxina pertussis el día 2, induce una forma de EAE crónica (>60 días) en todos los animales que se enferman (~70% en nuestra colonia).

Como se muestra en la FIG. 1, la terapia con pMHC de clase II-NP (NPs recubiertas con pMOG<sub>38-49</sub>/IA<sup>b</sup>) reduce la gravedad de la EAE establecida en ratones C57BL/6. Los ratones B6 fueron inmunizados con pMOG<sub>35-55</sub> en CFA y se trataron con la toxina pertussis i.v. Se otorgó una puntuación a los ratones para valorar los signos de EAE utilizando criterios establecidos a través de una escala de 15 puntos. Los ratones afectados se trataron con dos dosis semanales de 7,5 - 22,5 µg de NPs recubiertas con pMOG<sub>38-49</sub>, comenzando 21 días después de la inmunización. Es importante destacar que este efecto está asociado con una expansión sistémica de los linfocitos T autorreactivos cognados (FIG. 4). Además, aunque las médulas espinales de los ratones sin tratar tenían una desmielinización significativa e infiltrados de células mononucleares densas de la sustancia blanca (FIG. 5), los ratones tratados con pMHC-NP tenían significativamente menos desmielinización e infiltrados de células mononucleares (FIG. 6). Las FIGs. 7 y 8 muestran ejemplos representativos de los bordes de la médula espinal (2 ratones cada una). En este caso, de nuevo, los ratones tratados con pMHC-NP tienen significativamente menos desmielinización, así como una infiltración menor con células mononucleares. Por lo tanto, el enfoque terapéutico con pMHC-NP induce respuestas clínicamente significativas en diferentes enfermedades (T1D, EAE), modelos animales y fondos genéticos (NOD, C57BL/6).

Estos estudios proporcionan pruebas de la eficacia dependiente de la dosis y la viabilidad de los tratamientos para la EM utilizando complejos de antígeno de EM-MHC-nanopartícula.

#### Ejemplo 2

Procedimiento para la preparación de complejos de antígeno-MHC-nanopartícula.

Nanopartículas inorgánicas (óxido de hierro = IONP; oro = GNPs) de un tamaño deseado. Las IONPs se producen mediante descomposición térmica. Las IONPs sintetizadas de ese modo son biocompatibles y se pueden PEGilar para la conjugación de proteínas. Para recubrir con una proteína del pMHC y/u otras proteínas, las IONPs, NPs recubiertas con tensorioactivo reaccionan con enlazadores de PEG funcionalizados con la longitud adecuada. Los enlazadores se purifican por HPLC y se caracterizan mediante <sup>1</sup>H-NMR, MALDI/GPC y GPC, para confirmar la identidad química, la pureza, el peso molecular y la polidispersidad. Enlazadores y enfoques similares se pueden utilizar para recubrir GNPs, a excepción de que los enlazadores tendrán un grupo tiol (SH) en su extremo que se une con la NP.

#### Ejemplo 3

Tamaño, densidad y exposición de nanopartículas recubiertas con pMHC.

##### I. Síntesis y caracterización de NP recubierta con pMHC basada en oro.

Se sintetizaron nanopartículas de oro (GNPs) de tamaños específicos. El tamaño, la densidad, la carga superficial y la monodispersidad de las preparaciones de GNP se miden usando espectrofotometría, microscopía de transmisión de electrones (TEM) y dispersión de luz dinámica. Las muestras de GNP se concentran a continuación y se conjugan con complejos de pMHC mono-específicos, usando diferentes enfoques, como se describe a continuación. Los solicitantes han desarrollado métodos para cuantificar la valencia de pMHC por cada GNP y para concentrar las preparaciones de GNPs recubiertas con pMHC de diferentes tamaños a altas densidades (~10<sup>14</sup>/ml) sin comprometer la monodispersión (FIG. 11).

##### II. Caracterización de la capacidad de unión a pMHC de las GNPs.

Los complejos de pMHC recubrieron las GNPs de diversos tamaños utilizando dos enfoques diferentes: (i) una unión aleatoria de pMHC a la superficie de GNP a través de interacciones electrostáticas; y (ii) una unión direccional a través de un enlazador tiol-PEG-NH<sub>2</sub> (en este caso, se utilizó un enlazador adicional tiol-PEG como estabilizador de las GNPs para evitar la agregación). Se creía que el primer enfoque permitiría densidades muy altas de ligando (de pMHC por cada GNP), aunque comprometía la direccionalidad de la unión de pMHC (es decir, solo una fracción de las moléculas podía llegar a estar disponible para ser reconocida por los linfocitos T cognados). El segundo enfoque estaba destinado a generar GNPs recubiertas con pMHC que eran portadoras de densidades más bajas de pMHC pero que se unían direccionalmente, a través de sus extremos C-terminales. Ambos enfoques se sometieron a ensayo sobre GNPs con diámetros diferentes, en el intervalo de 14 a 40 nm. Se confirmó que, para los dos enfoques, la capacidad de unirse a pMHC de las GNPs es una función del tamaño y más específicamente del área superficial (mayor número de pMHCs sobre NPs más grandes). Asombrosamente, se encontró que la unión mediada por PEG no solo asegura la direccionalidad de la unión, sino que también mejora la capacidad de unión de las GNPs individuales (en contra de las expectativas iniciales). La Tabla 1 a continuación resume los datos.

Tabla 1. Capacidad de unión a pMHC de las GNPs

Diámetro (nm)	Área superficial: (x 10 <sup>2</sup> nm <sup>2</sup> )	pMHCs/GNP (absorción)	pMHCs/GNP (enlazador)
14	7		212
20	12		3.750
30	28	335	
40	50	2.850	5.250

### III. Actividad agonista frente a contenido en pMHC.

Se sometieron a ensayo los efectos de la valencia de pMHC, el tamaño de GNP, la densidad de GNP y la estrategia de recubrimiento sobre la actividad funcional (agonista) de las GNPs recubiertas con pMHC *in vitro*. Se comparó la capacidad de diversas preparaciones de IGRP<sub>206-214</sub>-K<sup>d</sup>-GNP para activar linfocitos T CD8+ sin tratamiento previo (específicos de IGRP<sub>206-214</sub>) cognados (en esta memoria denominados "linfocitos T 8.3-CD8+") obtenidas a partir de ratones NOD con el receptor de linfocitos T (TCR) transgénicos (o ratones 8.3-NOD). El primer grupo de experimentos estaba destinado a comparar los efectos de la valencia de IGRP<sub>206-214</sub>-K<sup>d</sup> (pMHC) sobre un intervalo de densidades de GNPs en el cultivo. Las GNPs conjugadas con un complejo de pMHC de control (no cognado) (TUM-K<sup>d</sup>) se utilizaron como controles negativos. Como era de esperar, las GNPs recubiertas con IGRP<sub>206-214</sub>-K<sup>d</sup> (pero no recubiertas con TUM-K<sup>d</sup>) activaban estos linfocitos T (tal y como se midió por la producción IFN $\gamma$ ) y lo hicieron de un manera dependiente de la dosis de GNP (por lo tanto, de la dosis de pMHC). La FIG. 12 muestra un experimento que emplea GNPs de ~14 nm recubiertas con diferentes cantidades de moléculas de pMHC/GNP utilizando el método del enlazador. La FIG. 12 compara las cantidades de IFN $\gamma$  secretada por los linfocitos T 8.3-CD8+ cognados como respuesta a dos muestras diferentes de pMHC-GNP (ambas consistían en ~2x10<sup>13</sup> GNPs de 14 nm de diámetro/ml). Au-022410 y Au-21910 eran portadoras de ~250 y ~120 pMHCs/GNP, respectivamente. Au-011810-C era portadora de ~120 pMHCs/GNP de control. Las GNPs recubiertas con cantidades superiores en más del doble de complejos de pMHC/GNP tenían una actividad agonista superior. Por tanto, la actividad agonista de las GNPs recubiertas con pMHC es una función del contenido total en pMHC (GNP). Estos resultados eran contradictorios, ya que el estado de la técnica sugería que en ausencia de moléculas coestimuladoras sobre las NPs, un aumento de las cantidades de pMHCs sobre las NPs individuales también aumentaría la avidéz y debería favorecer la eliminación (muerte celular), en lugar de una proliferación y secreción de citocinas desde los linfocitos T cognados. Esto sería cierto tanto para los linfocitos T con avidéz reducida como con avidéz elevada. Por ejemplo, un trabajo previo de los solicitantes (Han et al., (2005) Nature Medicine 11(6): 645-652) y otros, indicaba que los péptidos reconocidos con alta avidéz o los péptidos reconocidos con baja avidéz pero proporcionados en concentraciones elevadas, tienen una mayor capacidad para eliminar los linfocitos T cognados *in vivo*. Por lo tanto, en el contexto de una administración terapéutica de nanopartículas recubiertas con antígeno-MHC por vía intravenosa o péptidos solubles, los linfocitos T cognados deben someterse a delección de una manera dependiente de la afinidad del péptido y de la dosis. Esta expectativa no se cumplió por los datos mostrados en la FIG. 12.

### IV. Un umbral de valencia en la actividad agonista de los complejos de péptido-MHC-nanopartícula

Para investigar más a fondo el papel de la valencia del péptido-MHC (pMHC) sobre las propiedades agonistas de nanopartículas conjugadas con pMHC (pMHC-NPs), se comparó *in vitro* la capacidad de NPs de óxido de hierro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) con 8 nm de diámetro acopladas covalentemente con cantidades crecientes de monómeros de IGRP<sub>206-214</sub>/K<sup>d</sup> pMHC, para desencadenar la secreción de IFN-gamma (IFN $\gamma$ ) a través de linfocitos T CD8+ (específicos de IGRP<sub>206-214</sub>/K<sup>d</sup>) cognados (en lo sucesivo denominados linfocitos T 8.3-CD8+) *in vitro*. Como se muestra en la Tabla 2, los linfocitos T 8.3-CD8+ producían cantidades insignificantes de IFN $\gamma$  cuando se cultivaban en presencia de NPs recubiertas con 8 monómeros de pMHC por NP, pero producían cantidades sustancialmente más altas de IFN $\gamma$  como respuesta a NPs recubiertas con valencias de pMHC más elevadas, incluso tan bajas como 11 monómeros de pMHC/NP, de una manera dosis-respuesta.

Tabla 2. Secreción de IFN $\gamma$  mediante linfocitos T 8.3-CD8+ como respuesta a NPs conjugadas con valencias crecientes de pMHC (con  $5 \times 10^{11}$  NPs/mL)

Nanopartículas (NPs)	Propiedad del núcleo	Tamaño del núcleo (nm)	Valencia de pMHC	Respuestas de IFN $\gamma$ (ng/ml)
IGRP-SFPM-110512	Fe3O4	8	8	0,03
IGRP-SFP-102912	Fe3O4	8	11	0,4
IGRP-SFP-012011	Fe3O4	8	14	0,2
IGRP-SFP-031511	Fe3O4	8	15	0,15
IGRP-SFP-051211	Fe3O4	8	31	0,7
IGRP-SFP-100711	Fe3O4	8	39	0,9
IGRP-SFP-011411	Fe3O4	8	54	2,3

Este efecto positivo de la valencia de pMHC sobre la actividad agonista de pMHC-NPs se mantuvo en un intervalo de densidades de pMHC-NP (FIG. 13). Sorprendentemente, sin embargo, aunque  $25 \times 10^{11}$  NPs (por ml) que eran portadoras de 11 pMHCs/NP tenían una actividad agonista similar a  $5 \times 10^{11}$  NPs (por ml) que eran portadoras de 54 pMHCs/NP, aumentar el número de NPs que eran portadoras de 8 pMHCs/NP a valores tan altos como  $40 \times 10^{11}$  NPs/ml, tenía efectos mínimos (FIG. 14). En conjunto, estos resultados indican que existe un umbral de valencia de pMHC, que se encuentra entre 9 y 11 pMHCs/NP, por debajo del cual aumentos relativamente grandes del número de NPs (es decir, 5 veces) no pueden superar la baja actividad agonista de las pMHC-NPs recubiertas con valencias bajas (se observa que el uso de  $>50 \times 10^{11}$  NPs en estos experimentos *in vitro* no es informativo debido a la toxicidad celular causada por altas densidades de NPs).

Este efecto del umbral de la valencia de pMHC se ilustra adicionalmente en la FIG. 15, en donde los datos de secreción de IFN $\gamma$  se normalizan a la concentración de pMHC total entregado por las NPs recubiertas en los cultivos. Las NPs que eran portadoras de 11 pMHCs/NP provocaban respuestas de IFN $\gamma$  significativamente más altas en un intervalo de concentraciones de pMHC, que las que desencadenaban NPs que eran portadoras de 8 pMHCs/NP. Además, las diferencias en las propiedades agonistas de estas dos preparaciones de NPs aumentaron sustancialmente con el contenido total de pMHC. Es decir, las diferencias en las propiedades agonistas de 2,4  $\mu\text{g/ml}$  de pMHC entregado por las NPs en forma de octámeros frente monodécámeros, eran mucho más elevadas que las diferencias en las propiedades agonistas de las mismas formulaciones en concentraciones 10 veces menores de pMHC total.

La FIG. 16 muestra que esos efectos profundos de la valencia de pMHC sobre las propiedades agonistas de pMHC-NPs también se pueden observar utilizando NPs más grandes (que pueden aceptar valencias mucho más altas de pMHC que las NPs de 8 nm estudiadas en las FIGs. 13-15) utilizadas con menores densidades de NP (para normalizar el contenido total en óxido de hierro en los cultivos). Aunque las NPs con un diámetro de 18 nm que son portadoras de  $<10$  pMHCs/NP prácticamente no tenían actividad biológica hasta  $4 \times 10^{11}$  NPs/ml, la actividad agonista de las NPs con un diámetro de 18 nm que eran portadoras de valencias de pMHC más elevadas, se incrementaba linealmente con la densidad de las NPs. Una comparación de las FIGs. 15 y 16 muestra adicionalmente que  $2 \times 10^{11}$  NPs de 18 nm que entregan 61 pMHCs/NP, tienen una actividad agonista similar a  $2 \times 10^{11}$  NPs de 8 nm que entregan un número similar (54) de pMHCs/NP, lo que indica que los efectos de la valencia de pMHC no se ven afectados significativamente por el volumen de la NP.

En conjunto, estos datos muestran que las NPs recubiertas con pMHC adquieren una potente actividad agonista por encima de un cierto umbral de valencia de pMHC (que se encuentra entre 9 y 11 pMHCs/NP). Incrementos en la valencia de pMHC o en la densidad de NPs pueden mejorar las propiedades agonistas de las pMHC-NPs que son portadoras de valencias "umbrales" o "supra-umbrales" de pMHC, pero no las propiedades agonistas de NPs que son portadoras de valencias "infra-umbrales" de pMHC.

#### V. Actividad agonista frente al tamaño de NP y la densidad.

Un análisis adicional indicó que el contenido total en pMHC no es el único factor que afecta a la actividad agonista de las pMHC-NPs *in vitro* y que el tamaño de las NPs también tiene un papel importante independiente. Esto se investigó mediante la comparación de la actividad agonista de dos muestras de pMHC-GNP de diferente tamaño (14 y 40 nm de diámetro, respectivamente) y diferentes valencias de pMHC, pero en condiciones de contenido total de pMHC similar. En el experimento mostrado en la FIG. 17, se utilizaron GNPs de 14 nm que eran portadoras de  $\sim 200$  moléculas

de pMHCs/GNP y GNPs de 40 nm que eran portadoras de ~5.000 pMHCs/GNP. La densidad de GNPs de estas dos muestras se ajustó (a  $3 \times 10^{13}$  y  $10^{12}$  GNPs/ml, respectivamente) para ajustar el contenido total en pMHC de cada muestra a ~450 µg/ml. Notablemente, los linfocitos T 8.3-CD8<sup>+</sup> respondían significativamente mejor al compuesto de pMHC/GNP de 14 nm que al de 40 nm, a lo largo de un intervalo de contenido total de pMHC, a pesar del hecho de que este último se diseñara con significativamente más complejos de pMHC que el primero. Esto sugirió que la densidad de GNPs (más GNPs/linfocito T cognado) es la clave. En otras palabras, NPs con 4x40 nm que eran portadoras de 1000 pMHCs/GNP (4000 pMHCs) serían menos deseables que NPs con 40x10 nm que eran portadoras de 100 pMHCs/GNP (4000 pMHCs). Por lo tanto, cuando se toman conjuntamente, estos datos sugieren que las preparaciones óptimas de pMHC-GNP son las compuestas por pequeñas GNPs utilizadas con altas densidades de pMHC. El aumento de la valencia de pMHC en estas NPs pequeñas aumenta aún más sus propiedades agonistas de forma sorprendente e inesperada.

#### VI. Actividad agonista frente a la exposición a pMHC.

Como se ha señalado anteriormente, las muestras de GNPs recubiertas con pMHC son producidas mediante el recubrimiento conjunto de GNPs con un enlazador de tiol-PEG-NH<sub>2</sub> de 3,4 kD (como aceptor de extremos carboxi de pMHC) con un enlazador de tiol-PEG que funciona como un estabilizador de la GNP. Para investigar si la longitud del enlazador de tiol-PEG estabilizador influye en sus propiedades antiagregación de GNP, se comparó la capacidad del enlazador de tiol-PEG estabilizador para unir moléculas de pMHC y/o las propiedades agonistas de las GNPs recubiertas con pMHC, GNPs recubiertas con pMHC preparadas usando enlazadores estabilizadores de diferentes tamaños (2 kD y 5 kD, más corto y más largo que el enlazador aceptor de pMHC, respectivamente) se comparó. Se encontró que ambos enlazadores tenían propiedades antiagregación similares y que el enlazador de 5 kD no inhibía la unión de pMHC con el enlazador de tiol-PEG-NH<sub>2</sub> más corto de 3,4 kD. Notablemente, sin embargo, las pMHC-GNPs que estaban protegidas por el tiol-PEG más corto (2 kD) tenían una actividad agonista superior *in vitro* que las recubiertas conjuntamente con el tiol-PEG más largo (5 kD) (FIG. 18). Esto sugiere que los enlazadores largos protectores de tiol-PEG protegen moléculas de pMHC unidas al enlazador aceptor frente a una exposición a linfocitos T cognados.

VII. Pequeñas NPs acopladas covalentemente con altas densidades de pMHC permiten efectos máximos de expansión de linfocitos T autorreguladores *in vivo*.

Las nanopartículas que tenían un diámetro promedio de aproximadamente 10 nm y estaban acopladas o bien a NRP-V7/K<sup>d</sup> (también referido como IGRP<sub>206-214</sub>-K<sup>d</sup>) o a TUM/K<sup>d</sup> (control) se prepararon de acuerdo con los métodos descrito en esta memoria y se sometieron a ensayo para estudiar su capacidad para inducir una expansión de linfocitos T CD8<sup>+</sup> autorreguladores cognados *in vivo*. La FIG. 19 muestra los resultados de un experimento en el que antígeno-MHC-GNPs se inyectaron por vía intravenosa a ratones NOD de 10 semanas de edad, de tipo silvestre, dos veces por semana durante 5 semanas consecutivas. Los cambios en el tamaño de la población de linfocitos T cognados en la circulación y en diferentes tejidos linfoides como respuesta a la terapia, se evaluaron mediante una tinción de las suspensiones celulares con tetrámeros de antígeno-MHC marcados con fluorescencia (tanto tetrámeros cognados, como tetrámeros de control irrelevantes). La administración de 10-100 menos GNPs de las que se habían observado previamente en la técnica (véase, por ejemplo, Tsai et al. (2010) *Immunity* 32(4): 568-580) en donde se analizaron nanopartículas recubiertas con 1-8 pMHCs, pero recubiertas con 150 antígeno-MHCs por GNP dio lugar a expansiones sustancialmente más elevadas (FIG. 19). Expandían los linfocitos T CD8<sup>+</sup> *in vivo* hasta niveles varias veces superiores (hasta un 44% de todos los linfocitos T CD8<sup>+</sup> circulantes) a los que normalmente se obtienen con nanopartículas recubiertas con un pMHC con una valencia de aproximadamente 8 (1-2% de células en sangre; véase, por ejemplo, Tsai et al., *Immunity*, 2010, Figura 1C). Los datos anteriores indican que las pequeñas nanopartículas recubiertas con valencias elevadas de antígeno-MHC ofrecen efectos máximos de expansión de linfocitos T. Estos resultados eran inesperados. Por consiguiente, no es la avidéz total de la interacción pMHC-NP-linfocito T la que es responsable del efecto terapéutico, sino más bien la avidéz de la población precursora que da lugar a los linfocitos T que se expanden como respuesta a la terapia con pMHC-NP. Esta interpretación es compatible con los datos descritos en esta memoria e implica que la valencia de pMHCs sobre las NPs debería aumentar la eficacia terapéutica de pMHC-NPs.

#### Ejemplo 4

Gran expansión de linfocitos T CD8<sup>+</sup> cognados mediante pMHC-GNPs recubiertas con valencias altas de pMHC. Después se determinó si las pMHC-NPs tienen un potencial para inducir expansiones masivas de linfocitos T cognados *in vivo*. Esto se realizó tratando los ratones con varias inyecciones de  $3 \times 10^{12}$  NPs de 10-14 nm que eran portadoras de 25 µg de pMHC total (~150 moléculas de IGRP<sub>206-214</sub>/K<sup>d</sup> por NP). Como se muestra en la FIG. 20, los ratones tratados con 10 dosis (dos veces a la semana durante 10 semanas) mostraban expansiones masivas de linfocitos T CD8<sup>+</sup> cognados reactivos con IGRP<sub>206-214</sub> (NRP-V7) en sangre periférica, en comparación con sus homólogos sin tratar (desde <0,4 a >17 o 47% de linfocitos T CD8<sup>+</sup>) (paneles inferiores). Tal expansión ya se había observado en un ratón que fue sacrificado después de 4 dosis de pMHC-NPs (paneles superiores). Las células expandidas con pMHC-NP se unían específicamente a tetrámeros de pMHC cognados pero no a los no cognados (NRP-V7/K<sup>d</sup> frente a TUM/K<sup>d</sup>, respectivamente).

## Ejemplo 5

## Preparación de nanopartículas de oro conjugadas con pMHC

Preparación de nanopartículas de oro conjugadas con pMHC (pMHC-GNPs, 12 y 30 nm). Preparación de GNPs. Las GNPs se prepararon mediante el calentamiento de agua D.D. (200 ml) en un matraz de bola en un baño de aceite de silicio hasta ebullición. Una solución de 1% de  $\text{HAuCl}_4$  se añadió a continuación (4 ml) en el agua hirviendo. La solución se agitó durante 10 min antes de añadir una solución de 1% de citrato de Na. Para GNPs de 12 nm, se añadieron 12 ml de solución de citrato de Na. Para GNPs de 30 nm, se añadieron 12 ml de solución de citrato de Na. Un color vino aparece inmediatamente después de la adición de la solución de citrato de Na. Para completar la reacción, la solución de GNP se agitó durante 30 minutos adicionales. Esta es una modificación del método descrito en Levy, R. et al. ("Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles". J Am Chem Soc 126, 10076-84 (2004)).

Modificación de la superficie de las GNPs. Las GNPs se pegilaron mediante la adición de tiol-PEG-NH<sub>2</sub> 25 mM (PM 3.400) y tiol-PEG 50 mM (PM 2.000, relación PEG/GNP 10.000:1) en solución de GNP. La solución se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente. Las GNPs pegiladas se lavaron después con 3 X 30 ml de agua D.D. esterilizada para eliminar el exceso de PEGs y se resuspendieron en 40 ml de tampón MES 100 mM ( $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$ ), pH 5,5.

Conjugación de pMHC. pMHCs (IGRP<sub>206-214</sub>/Kd, 4 mg) se añadió a la solución de las GNPs pegiladas, gota a gota con agitación suave a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante una hora antes de la adición de 20 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). La mezcla se agitó durante 4 horas adicionales. Los conjugados de pMHC-GNPs se lavaron después con 40 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2-7,4) tres veces y se resuspendieron en 8 ml de PBS.

## Ejemplo 6

## Preparación de nanopartículas de oro conjugadas con pMHC

Preparación de GNPs conjugadas con pMHC (pMHC-GNPs, 2-10 nm). Preparación de GNPs (2-5 nm). Las GNPs de 2-5 nm se prepararon disolviendo 250 mg (para GNPs de 2 nm) o 50 mg (para GNPs de 4 nm) de dodecilamina en 10 ml de solución DDAB (bromuro de didodecildimetilamonio 100 mM (DDAB) en tolueno). En segundo lugar, 100 mg de borohidruro de tetrabutilamonio (TBAB) se disolvieron en 4 ml de solución DDAB. Las soluciones de dodecilamina y TBAB se mezclaron después en un matraz de tres bocas de 50 ml, agitando bajo atmósfera de nitrógeno. Se determinaron 34 mg de  $\text{AuCl}_3$  en 4,5 ml de solución DDAB y se inyectaron rápidamente en una mezcla de solución TBAB y dodecilamina. La solución se vuelve de color rojo oscuro de inmediato, lo que indica la formación de las GNPs. La mezcla se agitó continuamente durante 30 min y se añadieron 15 ml de etanol a la mezcla. Después, la mezcla se centrifugó a 4.100 x g durante 12 min para precipitar las GNPs.

Preparación de GNPs (6-10 nm). Para preparar las GNPs de 6-10 nm, primero se disolvió ácido decanoico (172 mg) en 10 ml de tolueno y después se mezcló con diversas cantidades de solución TBAB (4 y 1 mL para GNPs de 6 y 10 nm, respectivamente) en un matraz de tres bocas de 50 ml, mientras que se agitaba bajo atmósfera de nitrógeno. A continuación,  $\text{AuCl}_3$  (34 mg disueltos en 4,5 ml de solución madre de DDAB) se inyectó rápidamente en la mezcla de solución TBAB y ácido decanoico. La solución se volvió de color rojo oscuro inmediatamente. La mezcla se agitó continuamente durante 30 min y se añadieron 15 ml de etanol a la mezcla. La mezcla se centrifugó a continuación a 4.100 x g durante 12 min para precipitar las GNPs.

Modificación superficial de las GNPs. Las GNPs se resuspendieron en 20 ml de ácido mercaptopropanoico (MPA) 0,1 M en metanol, pH 10 y se agitaron durante una hora a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 10 ml de acetato de etilo. Después, la mezcla se centrifugó a 4.100 x g durante 15 min. A continuación, las GNPs precipitadas se lavaron con 30 ml de agua D.D. esterilizada, tres veces y se resuspendieron en 20 ml de tampón MES 100 mM ( $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$ ), pH 5,5. A esta mezcla, se añadieron soluciones de polioxietileno bis(amina) 0,5 M (con una relación 10000:1 de PEG/GNP) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 0,1 M (concentración final de EDC 2 mM). Después, la mezcla se agitó durante 4 horas. Las GNPs pegiladas se lavaron con 3 X 30 ml de agua D.D. esterilizada para eliminar el exceso de PEG y EDC.

Conjugación de pMHC. Las GNPs pegiladas se resuspendieron en 20 ml de tampón MES 100 mM ( $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$ ), pH 5,5. A continuación se añadieron pMHCs (5 mg/ml, total 10 - 30 mg) a las GNPs resuspendidas (relación 500:1 de pMHC/GNP), gota a gota y se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente antes de añadir 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 0,1 M (concentración final de EDC 2 mM). La mezcla se agitó durante 4 horas más. Los conjugados de pMHC-GNPs se lavaron después con 40 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2-7,4) tres veces y se resuspendieron después en 10-20 ml de PBS.

Optimización de pMHC. El diseño óptimo de pMHC-NP consiste en pequeñas partículas recubiertas con monómeros de pMHC con la densidad más alta posible, que producen complejos con pMHCs separados por 3-4 nm. Las pMHC-NPs diseñadas siguiendo estos principios tienen una potencia óptima (actividad agonista máxima y propiedades de expansión de Treg a dosis más bajas de pMHC total). Esto se ha confirmado experimentalmente para los hallazgos de pMHC de clase I-NPs, también es cierto para Np recubierta con pMHC de clase II. Cuando se usa con una densidad

y dosis óptimas de pMHC, tanto las NPs recubiertas con pMHC de clase I como de clase II, pueden expandir linfocitos T autorreguladores cognados. Por lo tanto, el diseño ideal de pMHC-NP implica la capacidad de entregar pMHCs densamente empaquetados sobre las NPs.

5 Esto viene apoyado por dos observaciones experimentales: (1) NPs más grandes recubiertas con un número similar de pMHCs que sus homólogas más pequeñas, en particular con valores umbrales de valencia (es decir 10 pMHCs/NP) eran significativamente menos agonistas, independientemente del aporte total de pMHCs, el valor umbral de pMHCs con una separación individual de 10 nm requiere 60 pMHCs/NP y >120 pMHCs para alcanzar la distancia de separación de 3-4 nm; y (2) las NPs pequeñas recubiertas con densidades de pMHC muy altas, tienen la actividad agonista más elevada, también independientemente del aporte total de pMHCs. Por lo tanto, reducciones de la distancia de pMHCs (es decir, desde la distancia umbral de 10 nm a 2-4 nm) mediante el aumento de la densidad de pMHCs, aumenta la avidéz global y la capacidad de señalización de TCR de la interacción pMHC-NP-linfocito T. De este modo, el umbral para la actividad agonista se define por la densidad molecular de pMHCs (distancia intermolecular de pMHC) sobre la superficie de la NP, más que por el número de moléculas de pMHC.

15 En conjunto, esto sienta las bases para el diseño óptimo de formulaciones de pMHC-NP destinadas a expandir los linfocitos T reguladores específicos de autoantígenos *in vivo* para el tratamiento de trastornos autoinmunes. El solicitante ha mostrado que unas formulaciones óptimas pueden producir expansiones masivas de linfocitos T reguladores específicos de autoantígenos *in vivo* con frecuencias tan altas como 1 en 2 linfocitos T CD8+ o CD4+ circulantes con dosis extremadamente bajas de pMHC-NPs. Dado que los niveles terapéuticos son significativamente más bajos que los que inducen esas expansiones masivas, este enfoque se beneficia de un amplio margen de seguridad y eficacia que debería permitir el tratamiento de estados autoinmunes agresivos.

20 A lo largo de esta descripción, se ha hecho referencia a diversas publicaciones, patentes y memorias descriptivas de patentes publicadas mediante una cita identificadora.

#### Lista de Secuencias

SEQ ID NO: 1: antígeno pMOG<sub>38-49</sub>: GWYRSPFSRVVH.

25 SEQ ID NO: 2: Secuencia proteica del vector que comprende el antígeno pMOG<sub>38-49</sub> (FIG. 9).

SEQ ID NO: 3: Secuencia de ADN del vector que comprende el antígeno pMOG<sub>38-49</sub> (FIG. 9).

## REIVINDICACIONES

1. Un complejo de nanopartícula que comprende: un núcleo de nanopartícula; una serie de complejos de antígeno-MHC (pMHC) que comprenden una serie de proteínas del MHC y una serie de antígenos relacionados con la esclerosis múltiple; y en donde el complejo de nanopartícula tiene una densidad de antígeno-MHC desde 0,05 moléculas de pMHC/100 nm<sup>2</sup> a 30 moléculas de pMHC/100 nm<sup>2</sup> y en donde el núcleo de nanopartícula comprende opcionalmente un metal, un óxido metálico, un sulfuro metálico, un seleniuro metálico, un material magnético, un polímero, hierro, óxido de hierro u oro, y en donde el núcleo de nanopartícula está opcionalmente recubierto con dextrano, manitol y polietilenglicol.
2. El complejo de nanopartícula según la reivindicación 1, en donde el núcleo de nanopartícula comprende hierro, óxido de hierro u oro.
3. El complejo de nanopartícula según la reivindicación 1 o 2, en donde el antígeno es un antígeno obtenido a partir de una proteína seleccionada a partir del grupo de proteína básica de la mielina, glicoproteína asociada a la mielina, proteína de la mielina de oligodendrocito, proteína proteolipídica, oligoproteína de la mielina de oligodendrocito, proteína básica de oligodendrocito asociada con la mielina, proteína específica de oligodendrocito, proteínas de choque térmico, proteínas específicas de oligodendrocito NOGO A, glicoproteína Po, proteína de la mielina periférica 22 y 2'3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa y glicoproteína de mielina de oligodendrocito (MOG) o un antígeno correspondiente a SEQ ID NOS: 1 o 4-17, un péptido que tiene al menos 80% de identidad con un péptido que comprende la secuencia de SEQ ID NOS: 1 o 4-17 o un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de rigor de moderado a elevado con un polinucleótido que codifica una secuencia de SEQ ID NOS: 1 o 4-17 o un complemento de cada uno (en donde las condiciones de rigor elevado comprenden temperaturas de incubación de 55°C a 68°C; concentraciones de tampón de 1 x SSC a 0,1 x SSC; concentraciones de formamida de 55% a 75%; y soluciones de lavado de 1 x SSC, 0,1 x SSC o agua desionizada) o uno que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia de SEQ ID NO: 1 o 4-17.
4. El complejo de nanopartícula según las reivindicaciones 1 a 3, en el que la nanopartícula no es liposómica.
5. El complejo de nanopartícula según las reivindicaciones 1 a 3, en el que el complejo de antígeno-MHC no está unido covalentemente con el núcleo de nanopartícula o el complejo de antígeno-MHC está unido covalentemente con el núcleo de nanopartícula opcionalmente a través de un enlazador de menos de 5 kD de tamaño y en donde el enlazador comprende opcionalmente polietilenglicol.
6. El complejo de nanopartícula según las reivindicaciones 1 a 3, en el que el MHC del complejo de antígeno-MHC-nanopartícula es un MHC de clase I o II, en donde el MHC de clase I comprende opcionalmente toda o parte de una proteína HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G o CD-1 y el MHC de clase II comprende opcionalmente toda o parte de una proteína HLA-DR, HLA-DQ o HLA-DP.
7. El complejo de nanopartícula según la reivindicación 1 o 2, en el que la nanopartícula está recubierta con polietilenglicol.
8. El complejo de nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el núcleo de nanopartícula tiene un diámetro de 1 nm a 100 nm.
9. El complejo de nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene una relación de complejo de antígeno-MHC a nanopartículas de 10:1 a 1000:1.
10. Una composición que comprende un vehículo y una cantidad terapéuticamente eficaz del complejo de nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Un método para producir, preparar u obtener el complejo de nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende recubrir o formar un complejo con una serie de complejos de antígeno relacionado con la esclerosis múltiple-MHC sobre un núcleo de nanopartícula, en donde:
- el núcleo comprende, opcionalmente, un metal, un óxido metálico, un sulfuro metálico, un seleniuro metálico, un material magnético, un polímero, hierro, óxido de hierro u oro;
- en donde el núcleo de nanopartícula está recubierto opcionalmente con dextrano, manitol y polietilenglicol; y
- en donde los complejos de antígeno-MHC (pMHC) recubren el núcleo de nanopartícula con una densidad desde 0,05 moléculas de pMHC/100 nm<sup>2</sup> a 30 moléculas de pMHC/100 nm<sup>2</sup>.
12. El complejo de nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para uso en la expansión y/o el desarrollo de poblaciones de linfocitos T autorreactivos antipatógenos en un sujeto con esclerosis múltiple o un trastorno relacionado con la esclerosis múltiple.
13. El complejo de nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple o un trastorno relacionado con la esclerosis múltiple en un sujeto que lo requiere.

14. El complejo de nanopartícula para el uso según la reivindicación 13, en donde el trastorno relacionado con la esclerosis múltiple se selecciona a partir del grupo que consiste en neuromielitis óptica (NMO), uveítis y dolor neuropático.

15. Un kit que comprende el complejo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, e instrucciones para el uso.

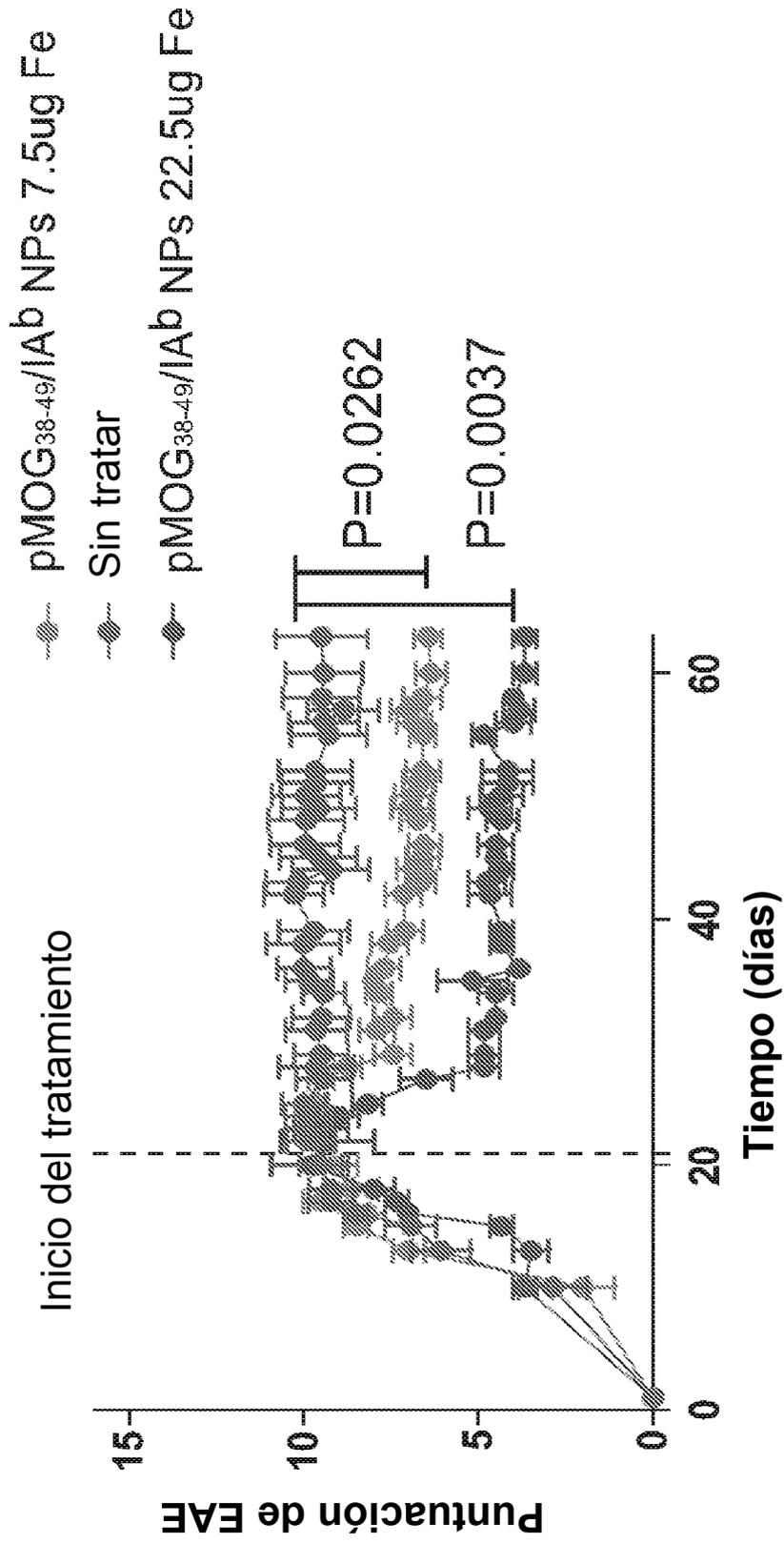


FIG.1

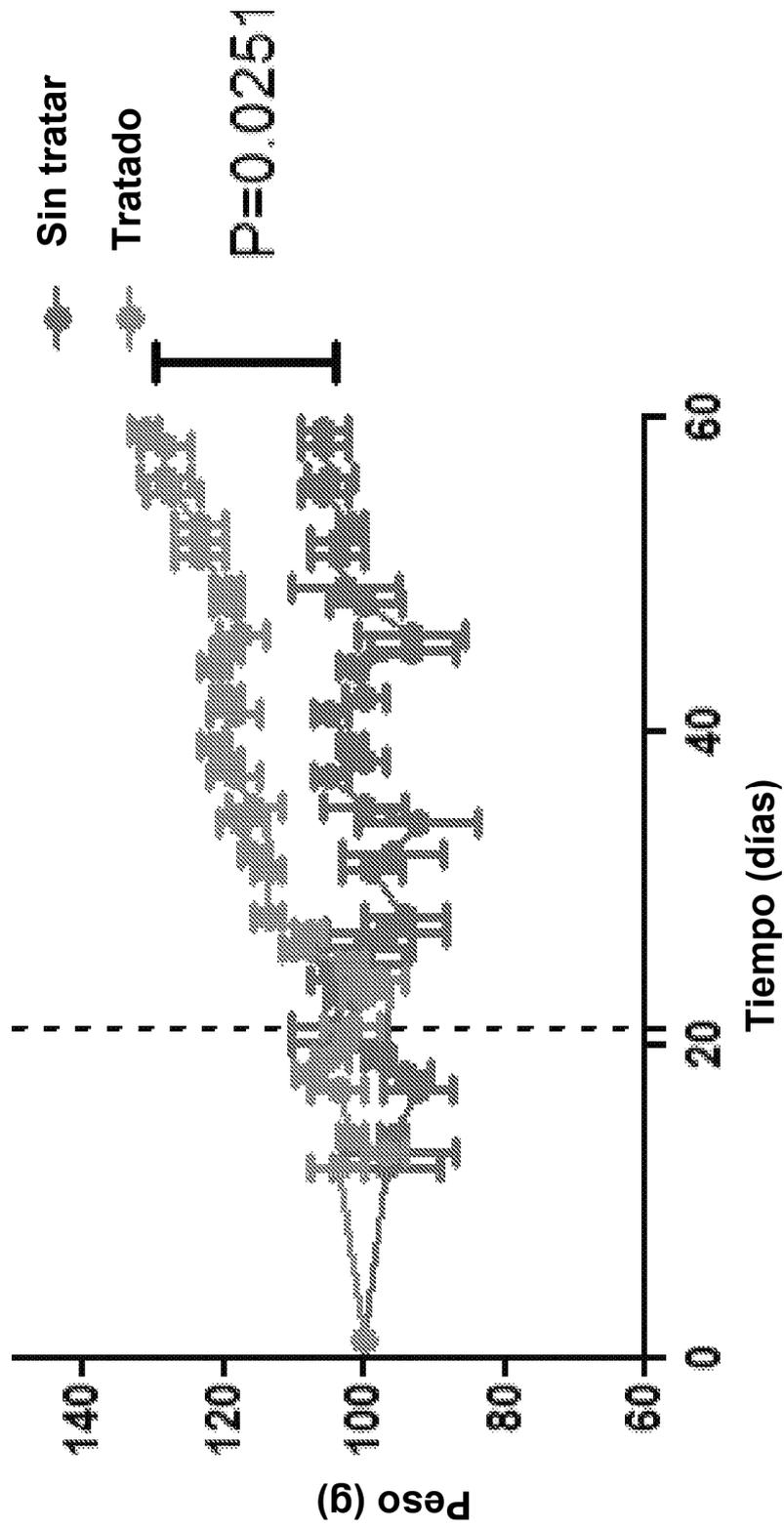


FIG. 2

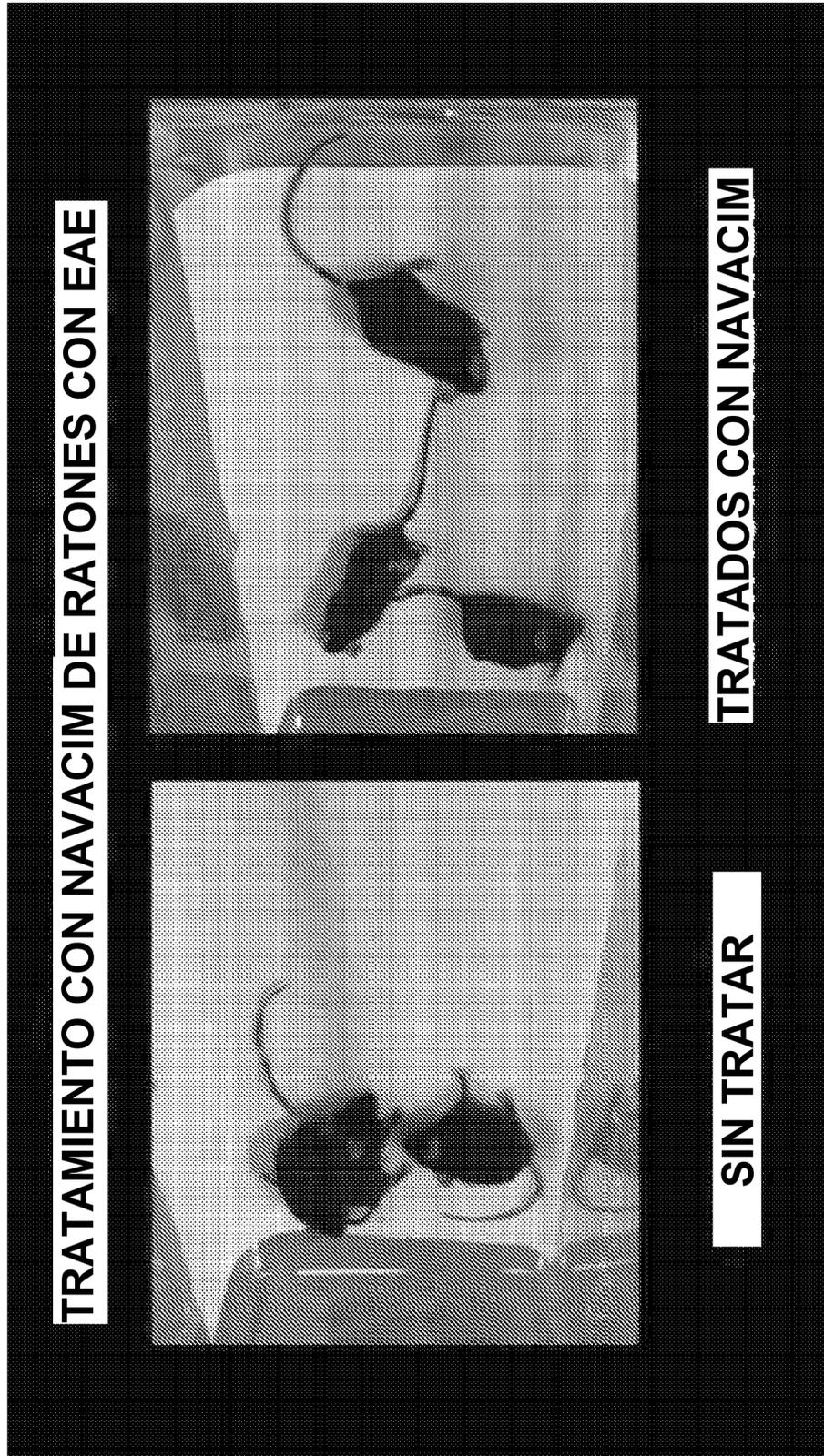


FIG.3

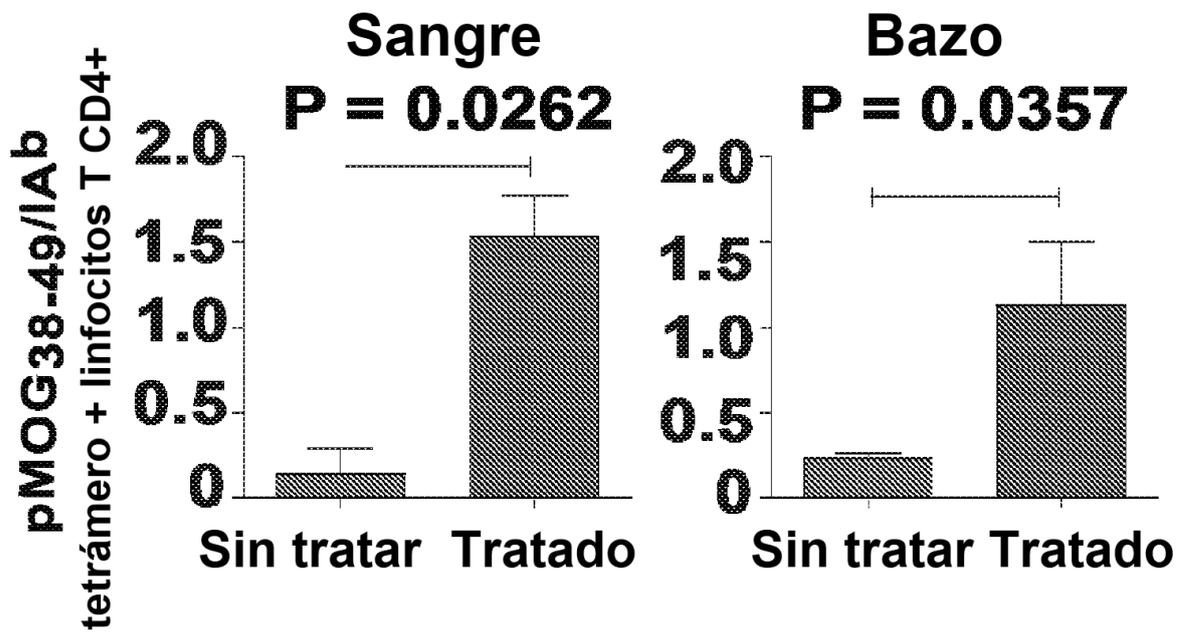
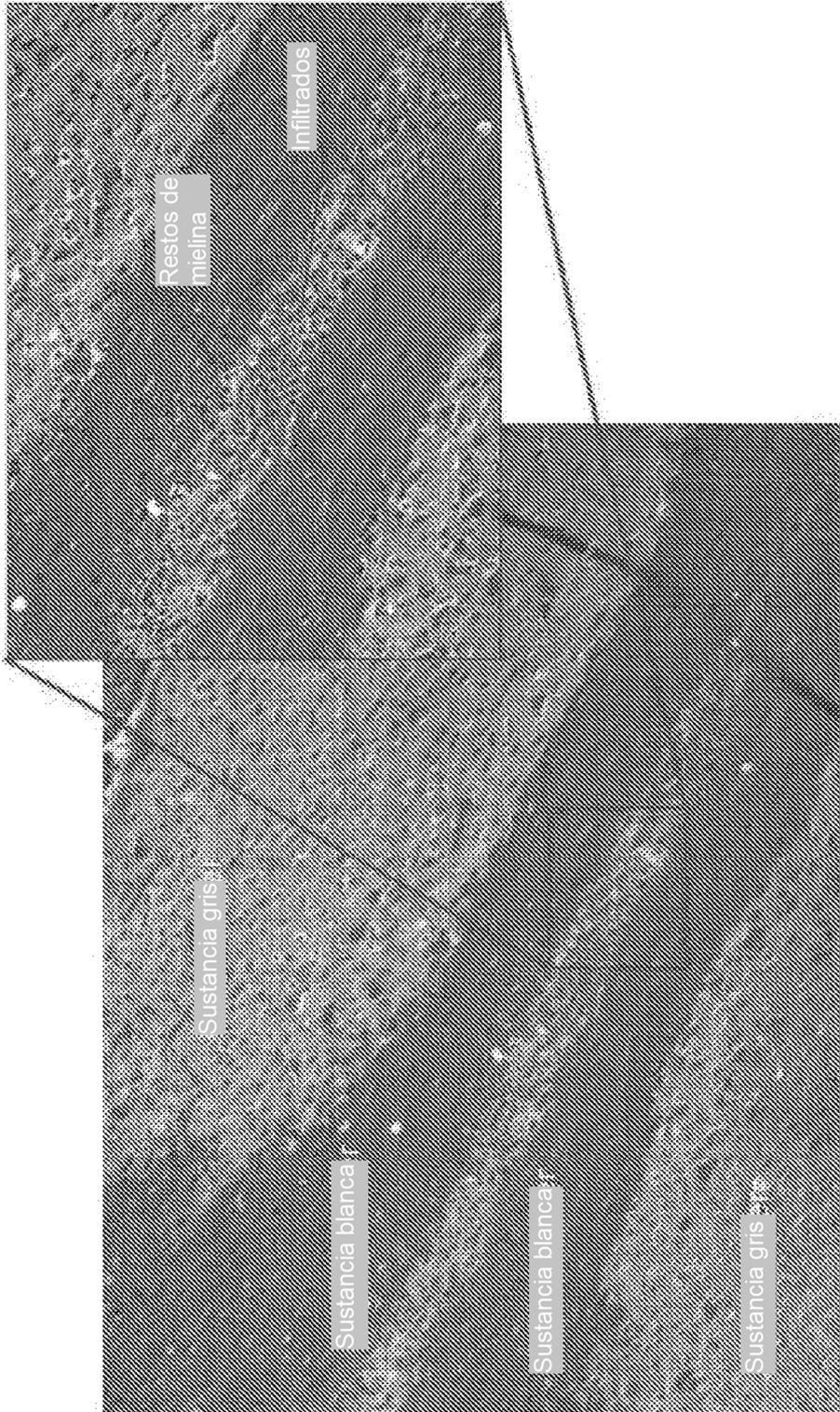


FIG. 4



Médula espinal de  
ratón sin tratar

FIG. 5

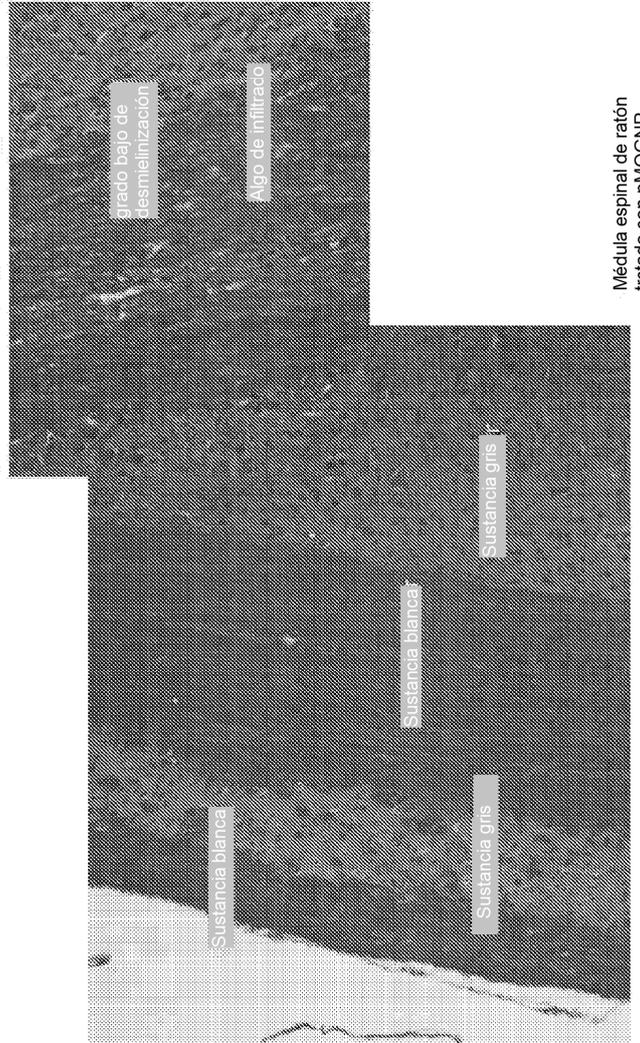
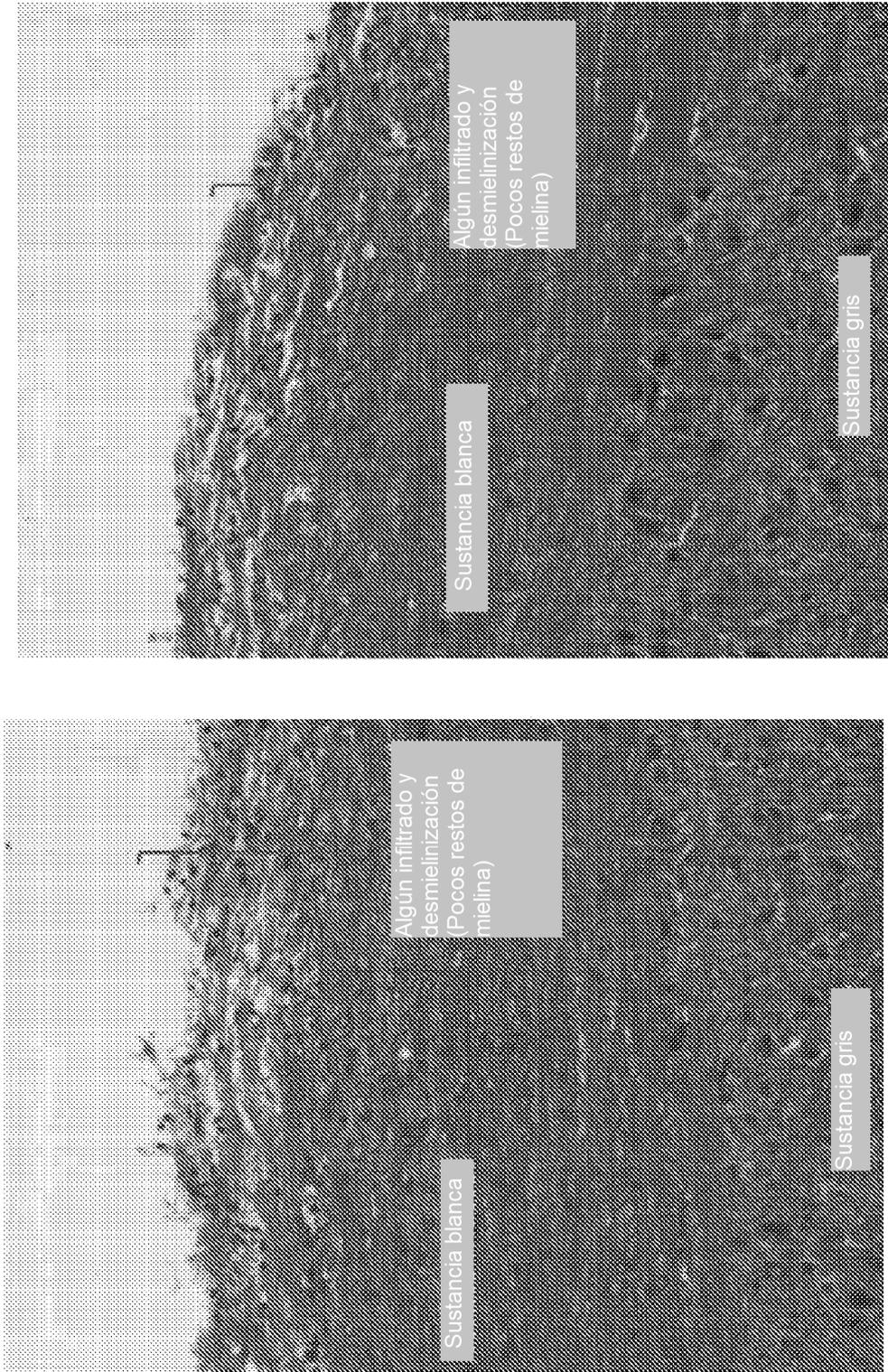


FIG. 6





Médula espinal de  
ratón tratado con pMOGNP

FIG. 8

KpnI  
~~~~~  
NcoI  
~~~~~

M A I I Y L I L L F T A V R G G ·

841 GG TACCATGGCT ATCATCTACC TCATCCTCCT GTTCACCGCT GTGCGGGGCG  
CC ATGGTACCGA TAGTAGATGG AGTAGGAGGA CAAGTGGCGA CACGCCCCCGC

NcoI SpeI  
~~~~~

W Y R S P F S R V V H G G G G S L V P R ·

901 GCTCGTATAG AAGTCCATTT AGCCGTGTTG TCCATGGAGG TGGAGGCTCA CTAGTGCCCC  
CGACCATATC TTCAGGTAAG TCGGCACAAC AGGTACCTCC ACCTCCGAGT GATCACGGGG

G S G G G G S G D S E R H F V Y Q F M G ·

961 GAGGCTCTGG AGGTGGAGGC TCTGGAGACT CCGAAAGGCA TTTCGTGTAC CAGTTCATGG  
CTCCGAGACC TCCACCTCCG AGACCTCTGA GGCTTCCCGT AAAGCACATG GTCAAGTACC

E C Y F T N G T Q R I R Y V T R Y I Y N ·

1021 GCGAGTGCTA CITCACCAAC GGGACGCAGC GCATACGATA TGTGACCAGA TACATCTACA  
CGCTCACGAT GAAGTGGTTG CCCTGCGTGC CGTATGCTAT AACTGGTCT ATGTAGATGT

R E E Y V R Y D S D V G E H R A V T E L ·

1081 ACCGGGAGGA GTACGTGCGC TACGACAGCG ACGTGGGCGA GCACCGCGCG GTGACCGAGC  
TGGCCCTCCT CATGCACGCG ATGCTGTGCG TGCACCCGCT CGTGGCGCGC CACTGGCTCG

FIG. 9

G R P D A E Y W N S Q P E I L E R T R A ·

1141 TGGGGCGGCC AGACGCCGAG TACTGGAACA GCCAGCCGGA GATCCTGGAG CGAACGCGGG  
ACCCCGCCCG TCTGCGGCTC ATGACCTTGT CGTCCGCGCT CTAGGACCTC GCTTGGCCCC

E L D T V C R H N Y E G P E T H T S L R ·

1201 CCGAGCTGGA CACGGTGTGC AGACACAAC TACGAGGGGCC GGAGACCCAC ACCTCCCTGC  
GGCTCGACCT GTGCCACAG TCTGIGTTGA TGCTCCCGG CCTCTGGGTG TGGAGGGAGC

R L E Q P N V V I S L S R T E A L N H H ·

1261 GCGGCTTGA ACAGCCCAAT GTCGTATCT CCTGTCCAG GACAGAGGCC CTCAACCACC  
CCGCCGAAC TGTCCGGTTA CAGCAGTAGA GGGACAGGTC CTGTCTCCGG GAGTTGGTGG

N T L V C S V T D F Y P A K I K V R W F ·

1321 ACAACACTCT GGTCTGCTCA GTGACAGATT TCTACCCAGC CAAGATCAAA GTGCCCTGGT  
TGTTGTGAGA CCAGACGAGT CACTGTCTAA AGATGGGTCG GTTCTAGTTT CACGCGACCA

R N G Q E E T V G V S S T Q L I R N G D ·

1381 TCCGGAATGG CCAGGAGGAG ACGGTGGGG TCTCATCCAC ACAGCTTATT AGGAATGGGG  
AGGCCTTACC GGTCTCTC TGCCACCCCG AGAGTAGGTG TGTCGAATAA ICCTTACCC

W T F Q V L V M L E M T P R R G E V Y T ·

1441 ACTGGACCTT CCAGGTCTGT GTCATGCTG AGATGACCCC TCGGCGGGA GAGGTCTACA  
TGACCTGGAA GGTCCAGGAC CAGTACGACC TCTACTGGGG AGCCGCCCT CTCCAGATGT

FIG. 9 (continuación)

```

      · C H V E H P S L K S P I T V E W R A Q S ·
1501 CCTGTCACGT GGAGCATCCC AGCCTGAAGA GCCCATCAC TGTGGAGTGG AGGGCACAGT
      GGACAGTGCA CCTCGTAGGG TCGGACTTCT CGGGGTAGTG ACACCTCACC TCCCCTGTCA

      · E S A W S K G G G G G G G G G R I A R L E ·
1561 CTGAGTCTGC CTGGAGCAAG GGAGGCGGAG GCGGTGGCGG AGGACGGATC GCTCGGCTAG
      GACTCAGACG GACCTCGTTC CCTCCGCCTC CGCCACCGCC TCCTGCCTAG CGAGCCGATC

      · E K V K T L K A Q N S E L A S T A N M L ·
1621 AGGAAAAAGT GAAAACCTTG AAAGCGCAA ACTCCGAGCT GCGTCCACG GCCAACATGC
      TCCTTTTCA CTTTGGAAAC TTTCGCGTTT TGAGGCTCGA CCGCAGGTGC CGGTTGTACG
                                          XhoI
                                          ~~~~~~
  XbaI
                                          ~~~~~~

      · R E Q V A Q L K Q K V M N H *
1631 TCAGGGAACA GGTGGCACAG CTTAAGCAGA AAGTCATGAA CCACTGAGCTAGAG
      AGTCCCTTGT CCACCGTGTC GAATTCGTCT TTCAGTACTT GGTGACTCGATCTC
    
```

FIG. 9 (continuación)

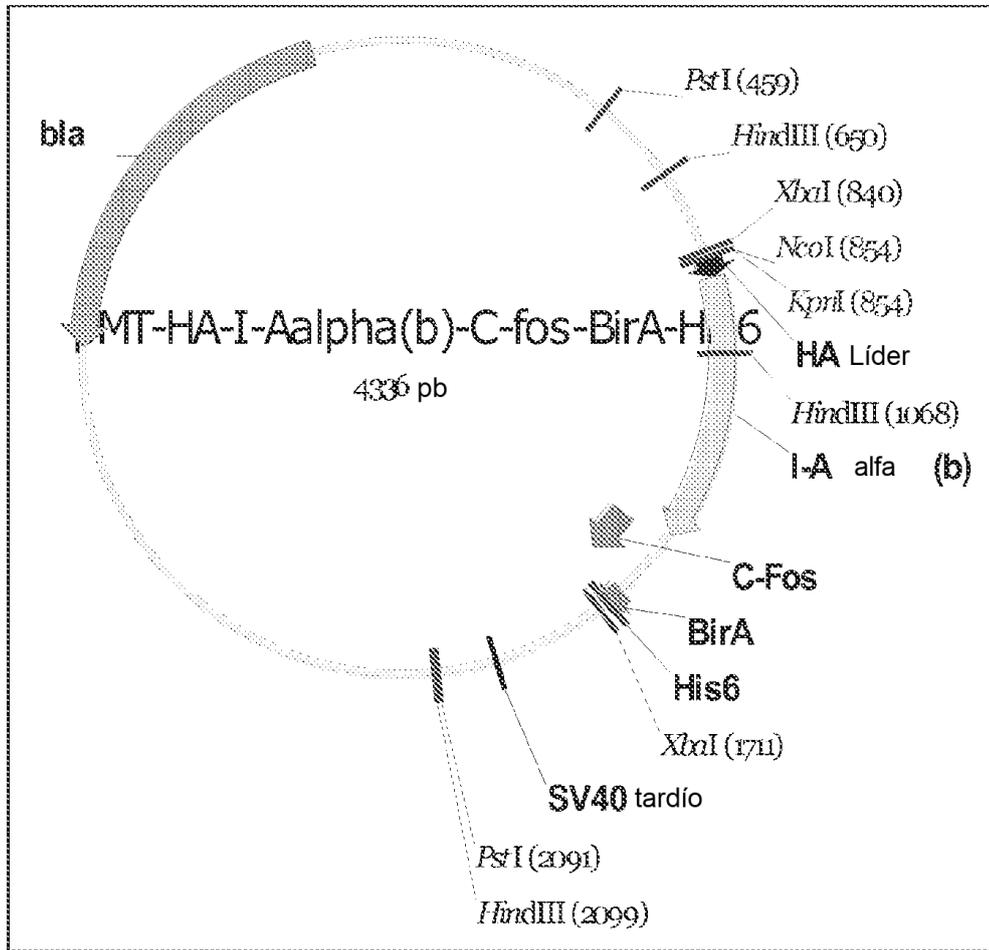


FIG. 10

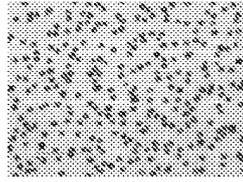


FIG. 11

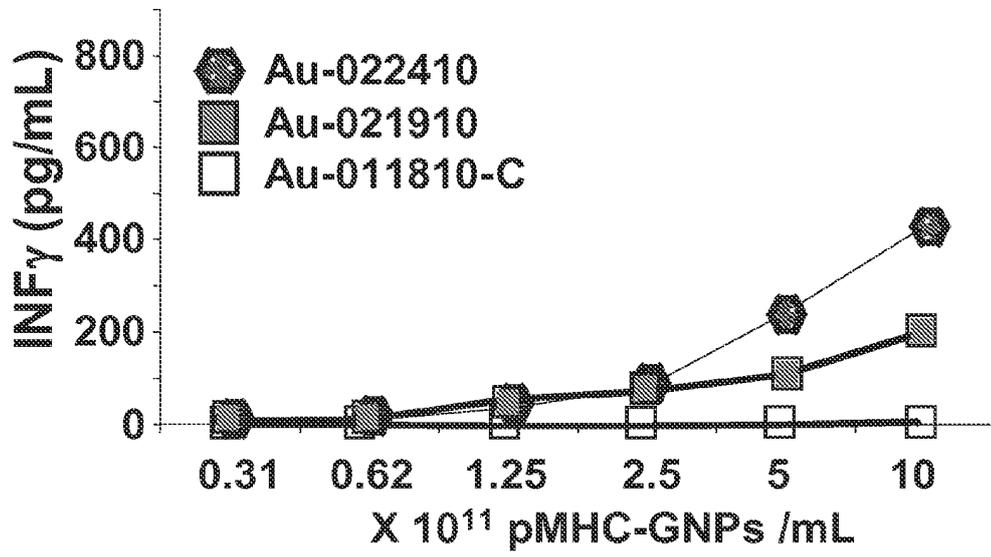


FIG. 12

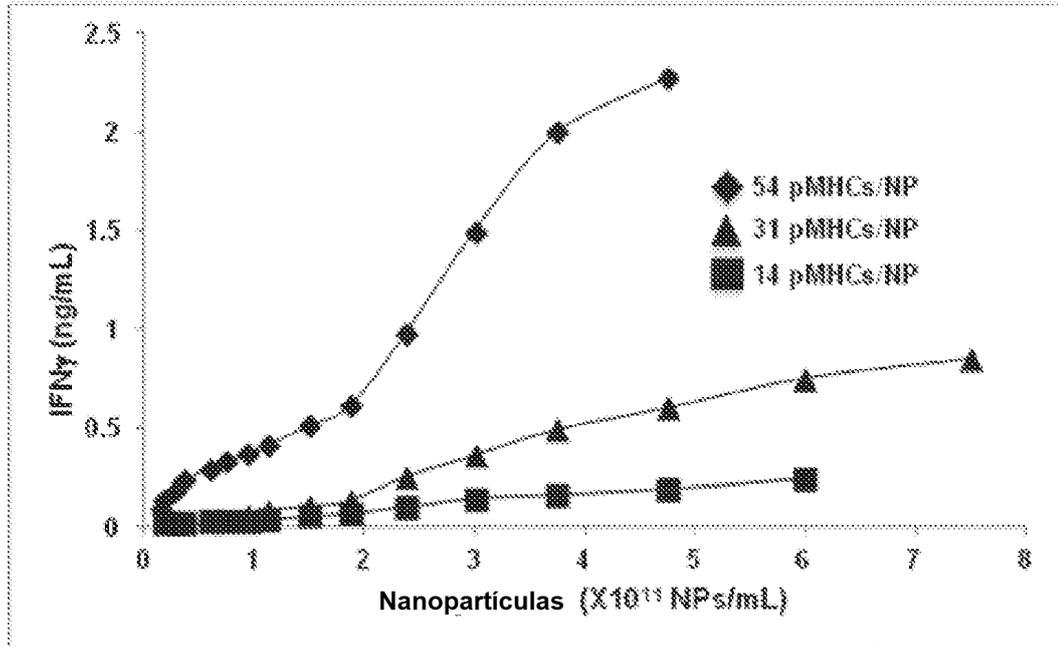


FIG. 13

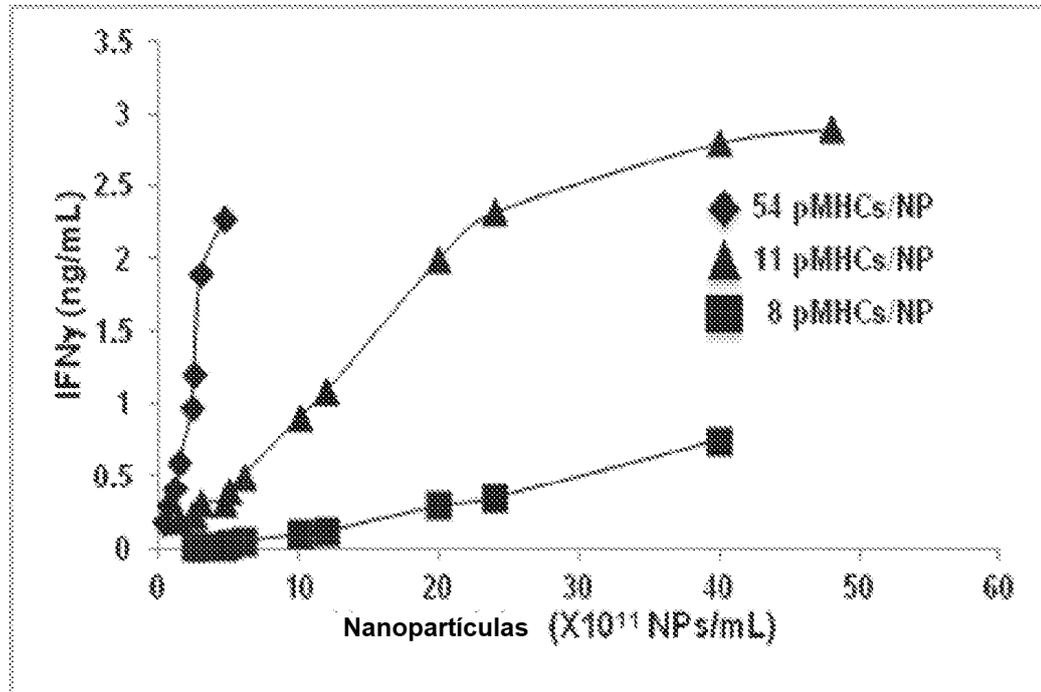


FIG. 14

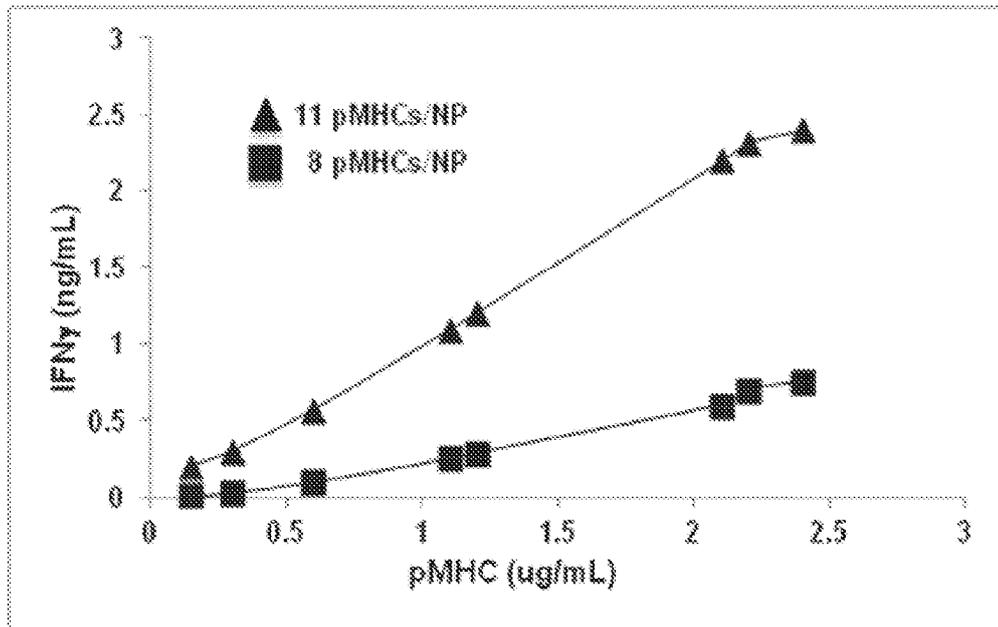


FIG. 15

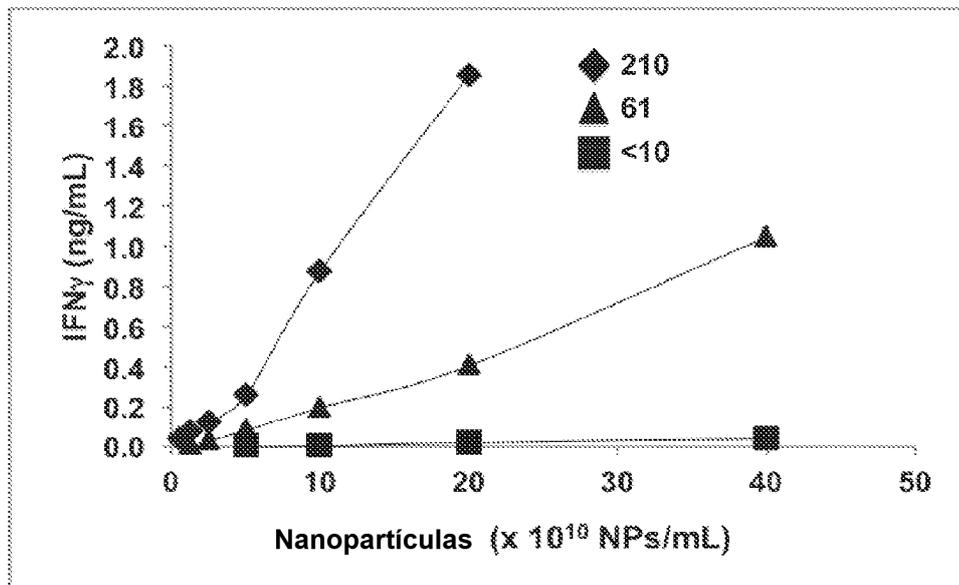


FIG. 16

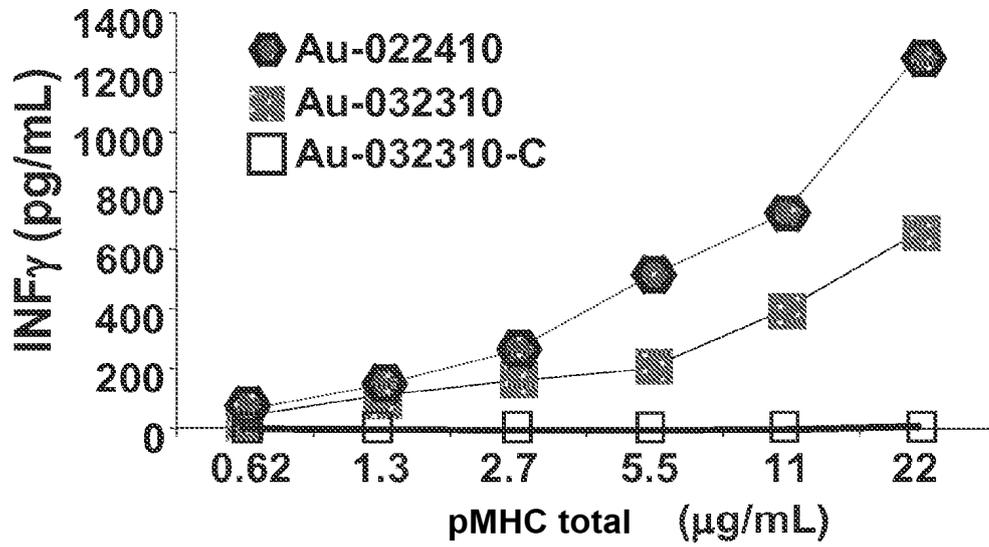


FIG. 17

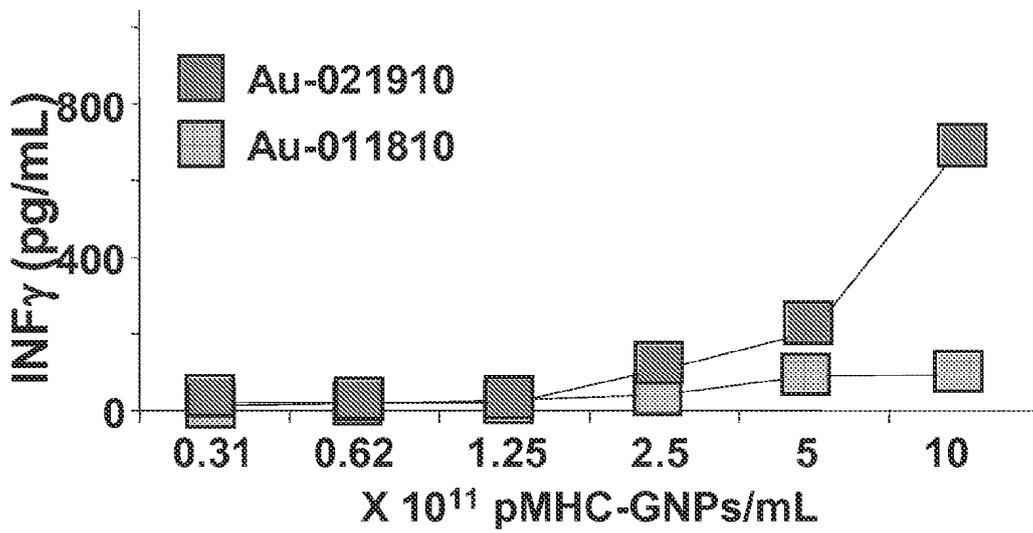


FIG. 18

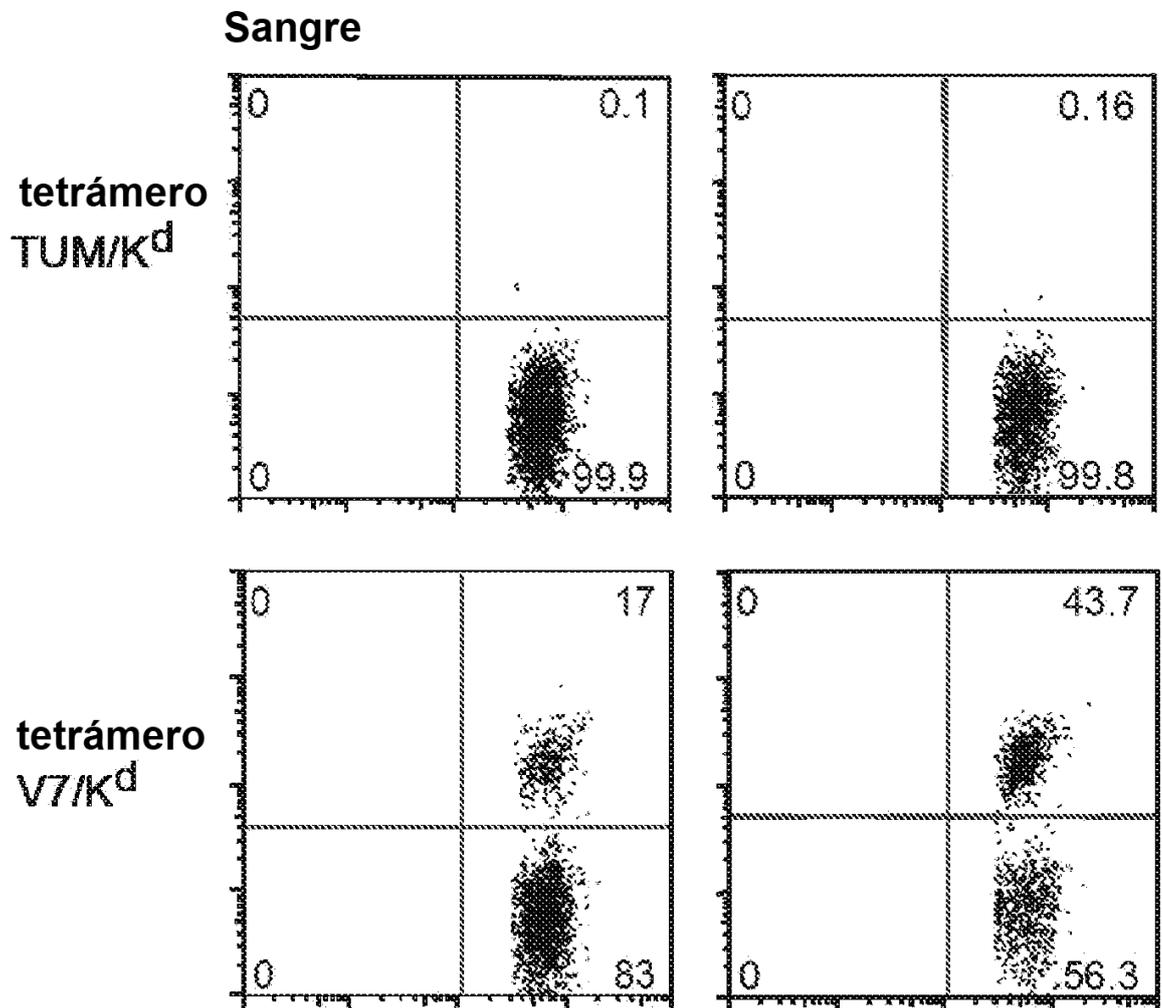


FIG. 19

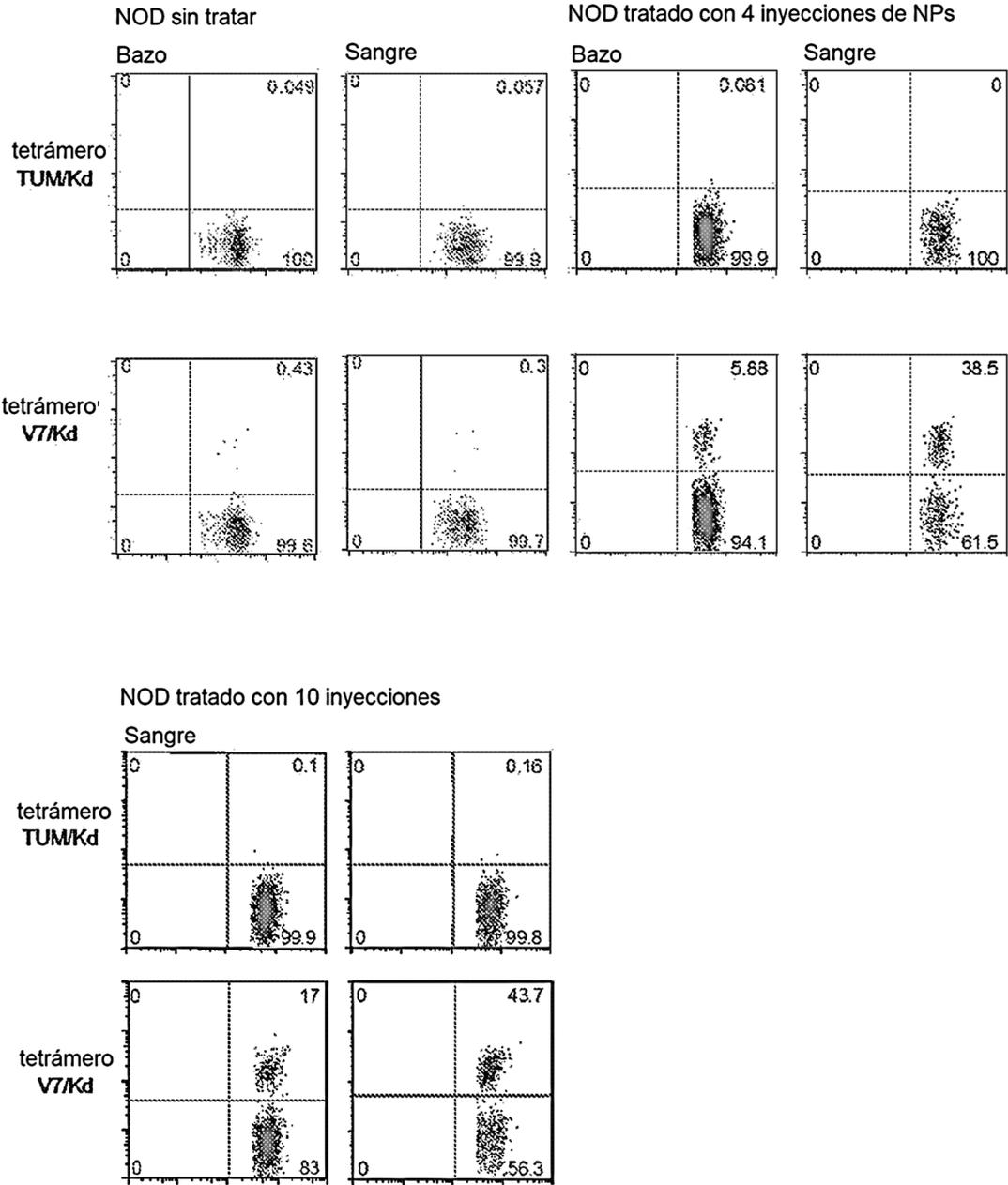


FIG. 20

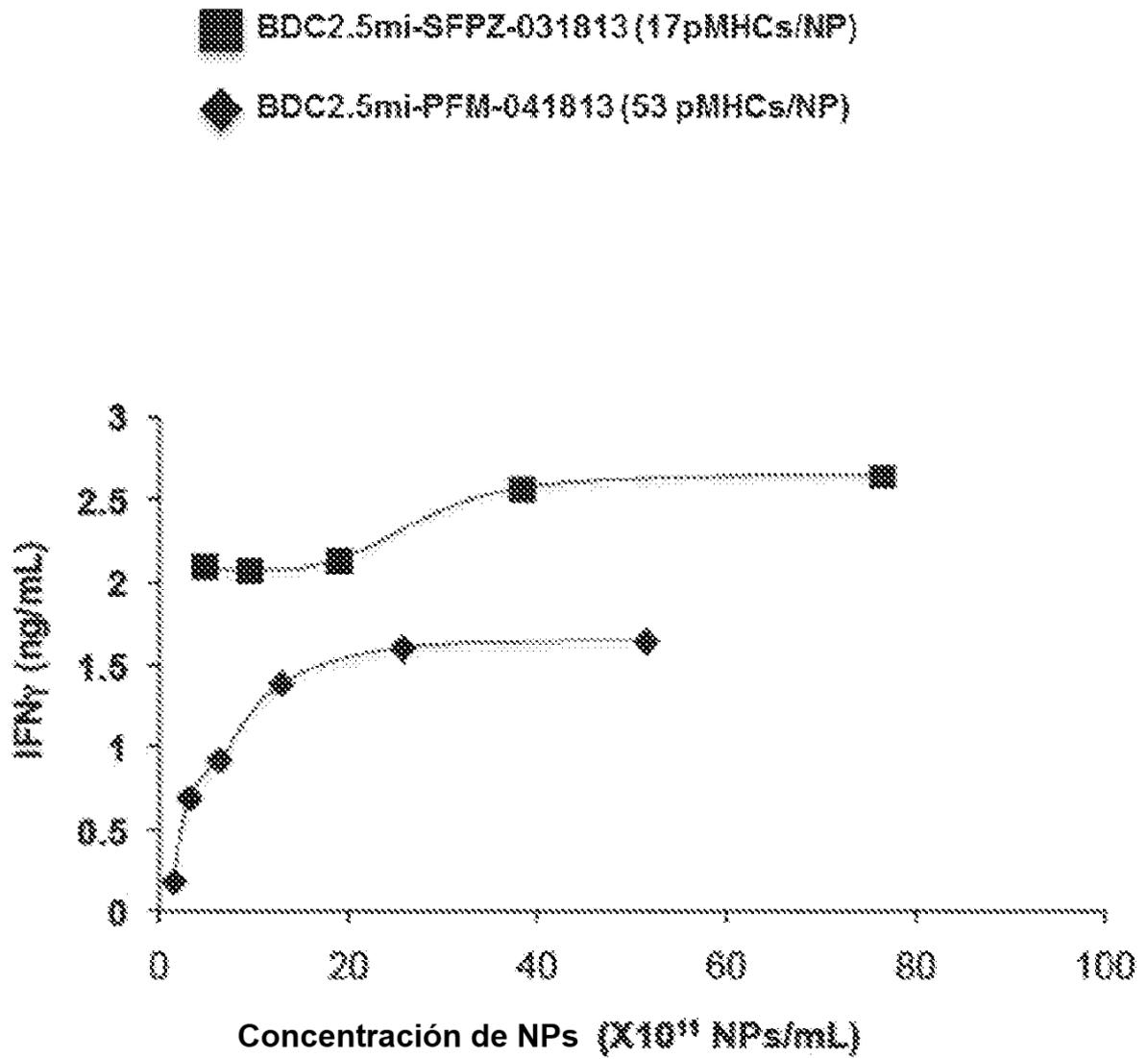


FIG. 21