

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 273**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)
A61K 9/14	(2006.01)
A61P 37/06	(2006.01)
C07K 14/74	(2006.01)
C12N 5/0781	(2010.01)
C12N 5/0783	(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2014 PCT/IB2014/003014**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15063616**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2014 E 14858299 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3065771**

54 Título: **Métodos y composiciones para inmunoterapia sostenida**

30 Prioridad:

04.11.2013 US 201361899826 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.11.2019

73 Titular/es:

**UTI LIMITED PARTNERSHIP (100.0%)
3655 36 Street NW
Calgary, AB T2L 1Y8, CA**

72 Inventor/es:

SANTAMARIA, PEDRO

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 730 273 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 inmunoterapia sostenida

5 **CAMPO DE LA DIVULGACIÓN**

La presente divulgación se refiere a composiciones y métodos relacionados con inmunoterapia y medicina.

10 **ANTECEDENTES**

15 Las enfermedades autoinmunes están causadas por un ataque de auto-tejidos por el sistema inmunológico. Una terapia ideal podría ser una que pudiera atenuar de forma selectiva la respuesta autoinmune (frente a todos los epítomos antigénicos que se tienen como diana en esa enfermedad) sin alterar la inmunidad sistémica (respuestas inmunes a antígenos extraños). Desafortunadamente, las especificidades de los linfocitos implicadas en una enfermedad autoinmune cualquiera son muchas y están definidas de manera incompleta, lo que hace que este sea un objetivo desafiante.

20 Wei Wu *et al.*, (Nanoscale Res Lett. 2008; 3 (11): 397-415) desvelan nanopartículas magnéticas de óxido de hierro, sus estrategias de síntesis y funcionalización superficial.

25 **SUMARIO**

Como respuesta a esta necesidad en la técnica, la invención reivindicada propone un método para preparar nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas con PEG como se define en las reivindicaciones.

30 En el presente documento también se describen composiciones terapéuticas útiles para tratar trastornos autoinmunes. Un aspecto se relaciona con un método para expandir y/o desarrollar poblaciones de linfocitos T y/o linfocitos B autorreactivos anti-patógenos en un sujeto que lo necesite, método que comprende, o que consiste básicamente en, o aún más que consiste en, administrar a ese sujeto un complejo de antígeno-nanopartícula de MHC de clase II ("NP") ("complejo de NP"), en el que el antígeno es un antígeno o autoantígeno relacionado con la autoinmunidad. En algunos aspectos, todos los antígenos en la NP particular son idénticos o pueden ser diferentes. En otro aspecto, los antígenos en la NP tienen diferentes secuencias de aminoácidos pero se aíslan a partir de la misma proteína antigénica. En un aspecto adicional, los antígenos en la NP son de diferentes antígenos. En otro aspecto, los MHCII son iguales o diferentes.

35 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un complejo de NP que comprende, o alternativamente que consiste básicamente en, o aún más que consiste en, una nanopartícula; una proteína MHC de clase II y un antígeno relevante para la enfermedad que puede estar en forma de un complejo de antígeno/MHCII, para uso en la expansión y/o el desarrollo de una o más poblaciones de linfocitos B reguladores y linfocitos TR1 (por ejemplo, linfocitos TR1 y CD4⁺), en un sujeto, en el que la nanopartícula tiene un diámetro seleccionado entre el grupo que consiste en: de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm de diámetro; de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 50 nm de diámetro o de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 20 nm o de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 20 nm de diámetro y la proporción del número de complejos de antígeno-MHCII con respecto a nanopartículas es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1000:1. En un aspecto, el complejo tiene una densidad de MHC de clase II de aproximadamente 0,05 pMHCII/100 nm² de área superficial de NP (incluyendo el revestimiento) a aproximadamente 25 pMHCII/100 nm² de área superficial de NP (incluyendo el revestimiento). El antígeno es un autoantígeno implicado en una respuesta autoinmune o un mimético del mismo tal como, por ejemplo, pre-diabetes, diabetes, esclerosis múltiple ("MS") o un trastorno relacionado con la esclerosis múltiple y, opcionalmente, en el que cuando la enfermedad es pre-diabetes o diabetes, el autoantígeno es un epítipo de un antígeno expresado por células beta pancreáticas o el autoantígeno IGRP, insulina, GAD o proteína IA-2. En otro aspecto, el componente MHC de clase II comprende todo o parte de un HLA-DR, HLA-DQ o HLA-DP. El complejo de antígeno-MHC de clase II se une mediante enlace covalente o no covalente a la nanopartícula. La nanopartícula puede ser bioabsorbible y/o biodegradable.

40 45 50 55 En un aspecto adicional, la nanopartícula es no liposomal y/o tiene un núcleo sólido, preferentemente un núcleo de oro u óxido de hierro. Cuando se une mediante enlace covalente, el complejo de antígeno-MHC de clase II se une mediante enlace covalente a la nanopartícula mediante un conector de menos de 5 kD de tamaño. En un aspecto, el conector comprende polietilenglicol (PEG). El pMHC se puede unir a la nanopartícula o al revestimiento de nanopartícula mediante cualquier estructura, que incluye, pero no se limita a, conectores o mediante reticulación. En un aspecto, el MHC se une a la nanopartícula o al revestimiento de manera direccional a través del extremo C-terminal.

60 65 El solicitante ha descubierto que la densidad de los complejos de antígeno-MHC de clase II en la nanopartícula contribuye al beneficio terapéutico. Por lo tanto, como se desvela en el presente documento, el complejo de antígeno-nanopartícula de MHCII puede tener una densidad definida en el intervalo de aproximadamente 0,05 moléculas de MHC por 100 nm² de área superficial de la nanopartícula (el área superficial medida para incluir

- cualquier revestimiento), suponiendo al menos 2 MHCII, 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, MHCII formando complejo con la nanopartícula. En un aspecto, el complejo tiene una densidad de MHCII de aproximadamente 0,01 MHCII por 100 nm² (0,05 MHCII/100 nm²) a aproximadamente 30 MHCII/100 nm², o alternativamente de 0,1 MHCII/100 nm² a aproximadamente 25 MHCII/100 nm², o alternativamente de aproximadamente 0,3 MHCII/100 nm² a aproximadamente 25 MHCII/100 nm², o alternativamente de aproximadamente 0,4 MHCII/100 nm² a aproximadamente 25 MHCII/100 nm², o alternativamente de aproximadamente 0,5 MHCII/100 nm² a aproximadamente 20 MHCII/100 nm², o alternativamente de 0,6 MHCII/100 nm² a aproximadamente 20 MHCII/100 nm², o alternativamente de aproximadamente 1,0 MHCII/100 nm² a aproximadamente 20 MHCII/100 nm², o alternativamente de aproximadamente 5,0 MHCII/100 nm² a aproximadamente 20 MHCII/100 nm², o alternativamente de aproximadamente 10,0 MHCII/100 nm² a aproximadamente 20 MHCII/100 nm², o alternativamente de aproximadamente 15 MHCII/100 nm² a aproximadamente 20 MHCII/100 nm², 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 MHCII/100 nm², el área superficial en nm² de la nanopartícula para incluir cualquier revestimiento. En un aspecto, cuando 9 o al menos 9 MHCII forman complejos con una nanopartícula, el intervalo de densidades es de aproximadamente 0,3 MHCII/100 nm² a aproximadamente 20 MHCII/100 nm².
- La presente divulgación también proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del complejo de NP como se describe en el presente documento y un vehículo, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, todos los complejos de NP en la composición son idénticos. En otro aspecto, los complejos de NP de la composición incluyen complejos de MHC-antígeno diversos o diferentes.
- En el presente documento se proporcionan además métodos para preparar los complejos y composiciones. El método puede comprender, o alternativamente consistir básicamente en, o además consistir adicionalmente en, revestir mediante enlace no covalente o formar complejos mediante enlace covalente de antígeno-MHC (por ejemplo, complejos MHCII) sobre una nanopartícula.
- También se proporcionan métodos médicos y de diagnóstico. En un aspecto, se proporciona un método para promover la formación, expansión y reclutamiento de linfocitos B reguladores y/o linfocitos TR1 (por ejemplo, linfocitos TR1 y CD4+) de una manera específica de antígeno en un sujeto que lo necesite, que comprende, o que alternativamente consiste básicamente en, o aún más que consiste en, administrar al sujeto una cantidad eficaz del complejo o composición de NP como se describe en el presente documento.
- En otro aspecto, se proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno autoinmune como se describe en el presente documento, por ejemplo, MS, un trastorno relacionado con MS, diabetes o pre-diabetes, en un sujeto que lo necesite, el método comprendiendo, o alternativamente consistiendo básicamente en, o aún más que consiste en, administrar al sujeto una cantidad eficaz del complejo o composición de NP como se describe en el presente documento, en el que el autoantígeno es relevante para la enfermedad que se va a tratar, por ejemplo, para la prevención o el tratamiento de diabetes, el antígeno es un antígeno relevante para la diabetes. En un aspecto adicional, la enfermedad autoinmune es MS o un trastorno relacionado con MS y el antígeno es relevante para MS.
- También se proporcionan kits. Los kits comprenden, o alternativamente consisten básicamente en, o aún más que consisten en un complejo de NP como se describe en el presente documento o una composición e instrucciones de uso.
- En un aspecto, en el presente documento se proporciona un método para preparar nanopartículas que comprende la descomposición térmica o el calentamiento de un precursor nanopartícula. En una realización, la nanopartícula es un metal o una nanopartícula de óxido metálico. En una realización, la nanopartícula es una nanopartícula de óxido de hierro. En una realización, la nanopartícula es una nanopartícula de oro. En una realización, en el presente documento se proporcionan las nanopartículas preparadas de acuerdo con la presente tecnología. En una realización, en el presente documento se proporciona un método para preparar nanopartículas de óxido de hierro que comprende una reacción de descomposición térmica de acetilacetato de hierro. En una realización, la nanopartícula de óxido de hierro obtenida es soluble en agua. En un aspecto, la nanopartícula de óxido de hierro es adecuada para conjugación de proteínas. En una realización, el método comprende una reacción de descomposición térmica de una sola etapa.
- En un aspecto, la descomposición térmica se produce en presencia de moléculas de PEG funcionalizado. En la **Tabla 1** se muestran ciertos ejemplos no limitantes de conectores de PEG funcionalizado.
- En un aspecto, la descomposición térmica comprende el calentamiento de acetilacetato de hierro. En una realización, la descomposición térmica comprende el calentamiento de acetilacetato de hierro en presencia de moléculas de PEG funcionalizado. En una realización, la descomposición térmica comprende el calentamiento de acetilacetato de hierro en presencia de éter bencílico y moléculas de PEG funcionalizado.

5 Sin quedar unidos a teoría alguna, en una realización, las moléculas de PEG funcionalizado se usan como reactivos reductores y como tensioactivos. El método que se proporciona en el presente documento para preparar nanopartículas simplifica y mejora los métodos convencionales, que usan tensioactivos que son difíciles de desplazar, o que no se desplazan hasta el final, por las moléculas de PEG para hacer que las partículas sean solubles en agua. De manera convencional, los tensioactivos pueden ser de coste elevado (por ejemplo, fosfolípidos) o tóxicos (por ejemplo, ácido oleico u oleilamina). En otro aspecto, sin limitarse a la teoría, el método de preparación de nanopartículas evita la necesidad de usar tensioactivos convencionales, consiguiendo de ese modo un alto grado de pureza molecular y solubilidad en agua.

10 En una realización, la descomposición térmica implica acetilacetato de hierro y éter bencílico y en ausencia de tensioactivos convencionales diferentes a los que se usan en el presente documento.

15 En una realización, la temperatura para la descomposición térmica es de aproximadamente 80 a aproximadamente 300 °C, o de aproximadamente 80 a aproximadamente 200 °C, o de aproximadamente 80 a aproximadamente 150 °C, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 250 °C, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 °C, o de aproximadamente 150 a aproximadamente 250 °C, o de aproximadamente 150 a aproximadamente 250 °C. En una realización, la descomposición térmica se produce durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1 y aproximadamente 2 horas.

20 En una realización, el método para preparar las nanopartículas de óxido de hierro comprende una etapa de purificación, tal como mediante el uso de una columna magnética LS de Miltenyi Biotec.

25 En una realización, las nanopartículas son estables a aproximadamente 4 °C en solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin ninguna degradación o agregación detectable. En una realización, las nanopartículas son estables durante al menos 6 meses.

30 En un aspecto, en el presente documento se proporciona un método para preparar complejos de nanopartículas que comprende poner en contacto pMHC con nanopartículas de óxido de hierro que se proporcionan en el presente documento. Sin limitarse a la teoría, pMHC codifica una Cisteína en su extremo carboxi terminal, que puede reaccionar con el grupo maleimido en el PEG funcionalizado a un pH de aproximadamente 6,2 a un pH de aproximadamente 6,5 de aproximadamente 12 a aproximadamente 14 horas.

35 En un aspecto, el método para preparar complejos de nanopartículas comprende una etapa de purificación, tal como mediante el uso de una columna magnética LS de Miltenyi Biotec

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

40 Las siguientes figuras forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la invención que se reivindica. La invención que se reivindica se puede entender mejor haciendo referencia a una o más de estas figuras en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas que se presentan en el presente documento.

45 Las **FIGS. 1A-1C** muestran esquemas de complejos de NP. La **FIG. 1A** es un esquema de una construcción de expresión de pMHC de clase I de una sola cadena (parte superior) y un perfil de citometría de flujo representativo de la unión del tetrámero de pMHC correspondiente (marcado con fluorocromo) a linfocitos T CD8⁺ afines. La **FIG. 1B** es un esquema que muestra los conectores y la estructura bidimensional de los complejos de NP. Como se puede observar, una NP puede contener el mismo antígeno formando complejo con el núcleo de la nanopartícula a través de diversos conectores químicos. La **FIG. 1C** muestra las NP funcionalizadas con maleimida conjugadas a las NP.

50 La **FIG. 2** muestra la estructura de un monómero de pMHC de clase II habitual (parte superior) y un perfil de FACS representativo de linfocitos T CD4⁺ afines teñidos con el tetrámero de pMHC correspondiente o sin teñir.

55 Las **FIGS. 3A-3B** muestran diferentes hiperglucemias revertidas de los pMHC de clase II-NP relevantes para T1D en ratones NOD con diabetes reciente. La **FIG. 3A** muestra curvas de glucosa en sangre en ratón individual. Los ratones se consideraron "curados" cuando permanecían normoglucémicos de forma estable durante 4 semanas, tras de lo cual el tratamiento se retiró. Como control se usó HEL₁₄₋₂₂, un antígeno extraño. La **FIG. 3B** muestra la incidencia de reversión de la enfermedad.

60 La **FIG. 4** muestra los ensayos de tolerancia a glucosa intraperitoneal (IPTGTTs) y la capacidad de producción de insulina en ratones curados a largo plazo. IDDM, ratones diabéticos sin tratar; Curados, ratones con normoglucemia a las 50 semanas de edad (> 30 semanas después de la retirada del tratamiento); Control, ratones no diabéticos sin tratar emparejados por edades (50 semanas de edad).

65 La **FIG. 5** muestra que los pMHC de clase II-NP relevantes para T1D expanden los linfocitos T CD4⁺ autorreactivos afines. Los datos corresponden a ratones tratados con 2.5mi/I-Ag7-NPs. En la parte inferior

derecha, la expansión es específica para el pMHC en las NP, ya que los ratones tratados con 2.5mi/I-Ag7-NPs no mostraron un aumento de los porcentajes de otras dos especificidades de linfocitos T CD4⁺ autorreactivos. PLN, ganglios linfáticos pancreáticos; MN, ganglios linfáticos mesentéricos; BM, médula ósea (un depósito de linfocitos T de memoria).

5 La **FIG. 6** muestra que los pMHC de clase II-NP relevantes para T1D expanden los linfocitos T CD4⁺ autorreactivos afines. La expansión se muestra para el bazo, pero se observan patrones similares en ganglios linfáticos, sangre y médula. "Inicio" corresponde a valores de tratamiento previo; "Curados" son ratones que se vuelven normoglucémicos con pMHC-NP (analizados a > 30 semanas de retirada del tratamiento); "IDDM" son ratones que recayeron después de retirar el tratamiento (~25 %); "50 semanas de edad" corresponde a controles no diabéticos sin tratar emparejados por edades.

10 La **FIG. 7** muestra que los pMHC de clase II-NP relevantes para T1D expanden los linfocitos T reguladores 1 ("Tr1 o TR1") similares a linfocitos de memoria afines.

15 La **FIG. 8** muestra que los linfocitos T CD4⁺ autorreactivos expandidos por pMHC de clase II-NP son productores de IL-10. Las células tetraméricas+ IGRP₁₂₆₋₁₄₅/I-A⁹⁷ de ratones tratados con IGRP₁₂₆₋₁₄₅/I-A⁹⁷-NPs o las NP de control se seleccionaron, se estimularon con péptidos afines y no afines y los sups se sometieron a ensayo para contenido de citoquinas con tecnología Luminex.

20 La **FIG. 9** muestra que los pMHC de clase II-NP revierten la hiperglucemia de una manera dependiente de IL-10 y TGFβ. La **FIG. 9** muestra la capacidad de IGRP₄₋₂₂/IA⁹⁷-NPs para restaurar la normoglucemia (parte superior), expandir los linfocitos Tr1 afines (parte inferior izquierda) y suprimir la presentación de autoantígenos en los PLN (para linfocitos T CD8⁺ reactivos para IGRP₂₀₆₋₂₁₄; parte inferior derecha) de ratones tratados con anticuerpos bloqueadores de citoquinas ("Abs"). Los Abs anti-IL10 y anti-TGFβ restauran parcialmente la presentación de autoantígenos e inhiben el efecto terapéutico de pMHC-NPs, sin alterar la expansión de los linfocitos Tr1.

25 Las **FIGS. 10A-10B** muestran que la terapia con los pMHC de clase II-NP no compromete la inmunidad sistémica. La **FIG. 10A** muestra que los ratones NOD tratados con pMHC-NP pueden eliminar fácilmente una infección viral aguda (virus Vaccinia) (final, comparar el día 4 con respecto al día 14 después de la infección) a pesar de la expansión sistémica de los linfocitos T CD4⁺ Tr1 autorreguladores (parte superior). La **FIG. 10B** muestra que los ratones tratados con pMHC-NP (10 dosis) pueden remontar las respuestas de anticuerpos frente a KLH-DNP después de la inmunización en CFA, en comparación con los ratones no tratados y no vacunados.

30 La **FIG. 11** muestra que la terapia con pMHC de clase II-NP reduce la gravedad de la EAE establecida en ratones C57BL/6. Los ratones B6 se inmunizaron con pMOG₃₅₋₅₅ en CFA y se trataron con toxina Pertussis por i.v. Los ratones se puntuaron para detectar signos de EAE usando criterios establecidos con respecto a una escala de 15 puntos. Los ratones afectados se trataron con dos dosis semanales de 7,5-22,5 ug de las NP revestidas con pMOG₃₈₋₄₉/IA^b, comenzando 21 días después de la inmunización.

35 Las **FIGS. 12A-12C** muestran la estructura y las propiedades de los pMHC de clase II-NP. La **FIG. 12A** es una viñeta que representa las diferentes químicas que se pueden usar para revestir los pMHC mediante enlace covalente sobre las NP de óxido de hierro funcionalizadas y biocompatibles. La **FIG. 12B** es una micrografía electrónica de transmisión de las NP revestidas con pMHC. La **FIG. 12C** muestra perfiles de Dispersión de Luz Dinámica de las NP revestidas con pMHC con respecto a las que no están revestidas.

40 Las **FIGS. 13A-13C** muestran expansión y diferenciación de linfocitos B afines en células Breg en ratones tratados con pMHC de clase II-NP. En la **FIG. 13A**, mezclas a 1:1 de linfocitos B PKH26-marcados/pulsados con 2.5mi de péptidos (parte inferior) (o células dendríticas, parte superior) más linfocitos B marcados con CFSE/pulsados con péptido GPI (parte inferior) (o células dendríticas, parte superior) se inyectaron en ratones NOD tratados con 2.5mi/IAg7-NP. Siete días más tarde, los hospedadores se analizaron para presencia de subconjuntos tanto de linfocitos B (parte inferior) como de células dendríticas (parte superior). Los paneles a la izquierda muestran resultados representativos y los histogramas a la Derecha muestran un resumen de los resultados obtenidos en varios experimentos. Los datos indican que 2.5mi de linfocitos B pulsados con péptido (pero no DCs) se expanden en ratones NOD tratados con 2.5mi/IAg7-NP. En B (panel a la izquierda), el Solicitante comparó el contenido de linfocitos B en los ganglios linfáticos pancreáticos (PLN) y mesentéricos (MLN) de ratones NOD tratados con 2.5mi/IAg7-NPs con respecto a las NP revestidas con los pMHC-NP (irrelevantes para diabetes) de control. Los datos muestran un aumento del reclutamiento de linfocitos B en lo mencionado anteriormente. En B (anhela la derecha), el Solicitante comparó el reclutamiento de linfocitos B a los PLN como una función del reclutamiento de linfocitos Tr1. Los datos se obtuvieron usando varias preparaciones de pMHC-NP diferentes. Los datos muestran una correlación estadísticamente significativa entre el reclutamiento de linfocitos TR1 expandidos por pMHC-NP y el reclutamiento de linfocitos B a los PLN. En la **FIG. 13B**, el Solicitante transfirió linfocitos B, pulsados con 2.5mi o péptidos de control, desde ratones NOD con inserción genética de IL10-eGFP en varios tipos de ratón donante diferentes (etiquetas en la parte superior). Después de 7 días, los bazos se analizaron para conversión de los linfocitos B transfundidos en linfocitos B productores de IL10 (eGFP+) que expresan niveles elevados de CD1d y CD5 (linfocitos B reguladores). Los datos muestran una

amplia expansión y conversión de linfocitos B afines (con carga de 2.5mi) en células B-reg solo en hospedadores tratados con 2.5mi/IAg7-NP.

La **FIG. 14** muestra la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro de superficie funcionalizado mediante descomposición térmica de acetilacetonato de hierro y bioconjugación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se debe entender que la invención que se reivindica no se limita a realizaciones particulares descritas, ya que tales pueden, por supuesto, variar. También se debe entender que la terminología usada en el presente documento tiene la finalidad de describir solo realizaciones particulares, y no pretende ser limitante.

Se debe indicar que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno" y "el" incluyen referentes en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un excipiente" incluye una pluralidad de excipientes.

I. DEFINICIONES

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entiende a una experiencia habitual en la materia a la que pertenece la invención reivindicada. Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los siguientes significados.

Como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" o "comprende" pretende hacer referencia a que las composiciones y métodos incluyen los elementos mencionados, pero no excluyen otros. "Que consiste básicamente en", cuando se usa para definir composiciones y métodos, hará referencia a excluir otros elementos de cualquier significado básico para la combinación para la finalidad indicada. Por lo tanto, una composición que consiste básicamente en los elementos como se define en el presente documento podrían excluir otros materiales o etapas que no influyan materialmente en la característica o características básica(s) y novedosa(s) de la invención que se reivindica, tal como las composiciones para el tratamiento o la prevención de la esclerosis múltiple. "Que consiste en" hará referencia a que excluye más que los elementos traza de otros ingredientes y etapas del método esenciales. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de la invención que se reivindica.

Un "linfocito T auto-reactivo" es un linfocito T que reconoce un "auto-antígeno", que es una molécula producida y contenida por el mismo individuo que contiene el linfocito T.

Un "linfocito T patógeno" es un linfocito T que es perjudicial para un sujeto que contiene el linfocito T. Sin embargo, un linfocito T no patogénico no es básicamente perjudicial para un sujeto, y un linfocito T anti-patogénico reduce, mejora, inhibe o anula el daño de un linfocito T patógeno.

Como se usa en el presente documento, las expresiones linfocitos B reguladores o linfocitos reguladores B ("B-regs") se refieren a las células que son responsables del efecto antiinflamatorio, que se caracterizan por la expresión de CD1d, CD5 y la secreción de IL-10. Los B-regs también se identifican por la expresión de Tim-1 y pueden ser inducidos a través de la unión a Tim-1 para estimular tolerancia. Se mostró que la capacidad de ser linfocitos B-regs estaba dirigida por muchos factores estimulatorios tales como los receptores de tipo toll, CD40-ligando y otros. Sin embargo, la caracterización completa de los linfocitos B-regs está en desarrollo. Los linfocitos B-regs también expresan niveles elevados de CD25, CD86, y TGF- β . Este subconjunto de linfocitos B es capaz de suprimir la proliferación de Th1, contribuyendo de ese modo al mantenimiento de la auto-tolerancia. La potenciación de la función de los linfocitos B-reg debería convertirse en el objetivo de muchos fármacos inmunomoduladores, contribuyendo a un mejor control de las enfermedades autoinmunes. Véase por ejemplo: ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707422, con último registro el 31 de octubre de 2013.

Los linfocitos T reguladores 1 (Tr1) son un subconjunto de linfocitos T CD4⁺ que tienen propiedades reguladoras y son capaces de suprimir las respuestas inmunes específicas de antígeno *in vitro* e *in vivo*. Estos linfocitos T-reguladores 1 (Tr1) se definen por su perfil único de producción de citoquinas y producen altos niveles de IL-10 y TGF-beta, pero no IL-4 o IL-2. La IL-10 y el TGF-beta producidos por estas células median la inhibición de los linfocitos células T sin tratamiento previo *in vitro*. También existe evidencia de que los linfocitos Tr1 existen *in vivo* y se ha documentado la presencia de linfocitos T CD4(+) que producen IL-10 en pacientes con inmunodeficiencia combinada grave que han recibido trasplantes alogénicos de células madre. Los linfocitos Tr1 están implicados en la regulación de la tolerancia periférica y se podrían usar como una terapia celular para modular las respuestas inmunitarias *in vivo*. Véase por ejemplo: ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10887343, con último registro el 31 de octubre de 2013.

Los linfocitos T reguladores de tipo 1 (Tr1) se definen por su capacidad para producir altos niveles de IL-10 y TGF-beta. Los linfocitos Tr1 específicos para una diversidad de antígenos surgen *in vivo*, pero también se pueden

- diferenciar de los linfocitos T CD4⁺ sin tratamiento previo en presencia de IL-10 *in vitro*. Los linfocitos Tr1 tienen una capacidad de proliferación baja, que puede ser superada por IL-15. Los linfocitos Tr1 suprimen las respuestas de tipo 1 o 2 de los linfocitos T auxiliares sin tratamiento previo y de memoria a través de la producción de IL-10 y TGF-beta. La caracterización adicional de los linfocitos Tr1 a nivel molecular definirá sus mecanismos de acción y aclarará su relación con otros subconjuntos de linfocitos Tr. Se puede prever el uso de linfocitos Tr1 para identificar nuevas dianas para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, y como una terapia celular para modular la tolerancia periférica. Véase por ejemplo, ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11722624, con último registro el 31 de octubre de 2013.
- Los términos "inhibición", "reducción", o "prevención" o cualquier variación de estos términos, cuando se usan en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva incluyen cualquier disminución mensurable o inhibición completa para conseguir un resultado deseado.
- A lo largo de la presente solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar de error para el dispositivo o método que se está usando para determinar el valor. El término "aproximadamente", cuando se usa antes de una designación numérica, por ejemplo, temperatura, tiempo, cantidad y concentración, incluyendo el intervalo, indica aproximaciones que pueden variar en (+) o (-) un 10 %, un 5 %, o un 1 %.
- Por "biocompatible", se hace referencia a que los componentes del sistema de administración no causarán lesiones tisulares o lesiones al sistema biológico humano. Para impartir biocompatibilidad, los polímeros y excipientes que han tenido un historial de uso seguro en seres humanos o con estado GRAS (Generalmente Aceptado Como Seguro) se usarán de manera preferente. Por biocompatibilidad, se hace referencia a que los ingredientes y excipientes usados en la composición serán en última instancia "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 manera similar, el término "bioabsorbible" se refiere a nanopartículas preparadas a partir de materiales que experimentan bioabsorción *in vivo* durante un periodo de tiempo tal que se evita la acumulación a largo plazo del material en el paciente. En una realización preferente, la nanopartícula biocompatible es bioabsorbida durante un periodo de menos de 2 años, preferentemente menos de 1 año e incluso más preferentemente menos de 6 meses. La tasa de bioabsorción está relacionada con el tamaño de la partícula, el material usado y otros factores bien reconocidos por el experto en la materia. Para formar nanopartículas se puede usar una mezcla de materiales bioabsorbibles y biocompatibles. En una realización se pueden combinar óxido de hierro y un polímero bioabsorbible biocompatible. Por ejemplo, óxido de hierro y PGLA se pueden combinar para formar una nanopartícula.
- Un complejo de antígeno-MHC-nanopartícula ("complejo de NP") se refiere a la presentación de un péptido, carbohidrato, lípido u otro segmento, fragmento o epítipo de una molécula antigénica o proteína antigénica (es decir, auto-péptido o autoantígeno) en una superficie, tal como una nanoesfera biodegradable biocompatible. "Antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a toda, parte, fragmento o segmento de una molécula que puede inducir una respuesta inmune en un sujeto o una expansión de células antipatogénicas.
- Un "mimético" es un análogo de un ligando o péptido dado, en el que el análogo es básicamente similar al ligando. "Básicamente similar" se refiere a que el análogo tiene un perfil de unión similar al del ligando, excepto porque el mimético tiene uno o más grupos funcionales o modificaciones que representan de forma colectiva menos de aproximadamente un 50 %, menos de aproximadamente un 40 %, menos de aproximadamente un 30 %, menos de aproximadamente un 20 %, menos de aproximadamente un 10 %, o menos de aproximadamente un 5 % del peso molecular del ligando.
- La expresión "linfocito T autorreactivo antipatogénico" se refiere a un linfocito T con propiedades antipatogénicas (es decir, linfocitos T que contrarrestan una enfermedad autoinmune tal como MS, una enfermedad o trastorno relacionado con MS o pre-diabetes). 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 TR1, linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺ y similares.
- La expresión "linfocito T antiinflamatorio" se refiere a un linfocito T que estimula una respuesta antiinflamatoria. La función antiinflamatoria del linfocito T se conseguía a través de la producción y/o secreción de proteínas antiinflamatorias, citoquinas, quimioquinas y similares. Las proteínas antiinflamatorias también pretenden incluir señales antiproliferativas que suprimen las respuestas inmunitarias. Las proteínas antiinflamatorias incluyen IL-4, IL-10, IL-13, IL-21, IL-23, IL-27, IFN- α , TGF- β , IL-1ra, G-CSF y receptores solubles para TNF e IL-6. Por consiguiente, los aspectos de la divulgación se refieren a métodos para tratar, en un paciente, un trastorno autoinmune, tal como MS, un trastorno relacionado con la MS, diabetes o pre-diabetes, el método comprendiendo, consistiendo básicamente en, o aún más consistiendo en administrar, al paciente, un complejo de antígeno-MHCII-nanopartícula, en el que el antígeno es un antígeno relevante para la enfermedad.
- El término "IL-10" o "Interleuquina-10" se refiere a una citoquina codificada por el gen IL-10. La secuencia de IL-10 está representada por el N.º de Registro de GenBank: NM_000572.2 (ARNm) y NP_000563.1 (proteína).

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

"Una cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para conseguir la finalidad deseada, ejemplos no limitantes de las cuales incluyen: inicio de la respuesta inmune, modulación de la respuesta inmune, supresión de una respuesta inflamatoria y modulación de la actividad de los linfocitos T o poblaciones de linfocitos T. En un aspecto, la cantidad eficaz es aquella que funciona para conseguir una finalidad terapéutica establecida, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz. Como se describe en el presente documento en detalle, la cantidad, o dosificación, eficaz, depende de la finalidad y la composición, componente y se puede determinar de acuerdo con la presente divulgación.

El uso del término "un" o "uno" cuando se usa en conjunto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno", y "uno o más de uno".

Por "nanoesfera", "NP" o "nanopartícula" en el presente documento se hace referencia a una pequeña partícula discreta que se administra de forma singular o plural a un sujeto, muestra de células o muestra de tejido, según sea apropiado. En ciertas realizaciones, las nanopartículas tienen una forma básicamente esférica. En ciertas realizaciones, la nanopartícula no es un liposoma o partícula viral. En realizaciones adicionales, la nanopartícula es sólida o tiene un núcleo sólido. La expresión "básicamente esférica", como se usa en el presente documento, se refiere a que la forma de las partículas no se desvía de una esfera en más de aproximadamente un 10 %. A las partículas se le pueden aplicar diversos complejos de antígenos o péptidos conocidos. Se pretende un intervalo de tamaños de las nanopartículas de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1 μ m y, preferentemente, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm o alternativamente de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 50 nm, o alternativamente de aproximadamente 5 a 50 nm o alternativamente de aproximadamente 5 nm a 100 nm, y en algunos aspectos se refiere al diámetro promedio o medio de una pluralidad de nanopartículas cuando se desea una pluralidad de nanopartículas. Se pueden obtener partículas de tamaño nanométrico más pequeñas, por ejemplo, mediante el proceso de fraccionamiento mediante el cual se permite que las partículas más grandes sedimenten en una solución acuosa. A continuación la parte superior de la solución se recupera mediante métodos conocidos por las personas con experiencia en la materia. Esta parte superior está enriquecida en partículas de tamaño más pequeño. El proceso se puede repetir hasta que se genere un tamaño promedio deseado.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para hacer referencia a "y/o" a menos que se indique explícitamente que hace referencia solo a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación apoya una definición que se refiere solo a alternativas e "y/o".

Como se usa en el presente documento, 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 inmunitaria celular se provoca mediante la presentación de epítopos polipeptídicos en asociación con moléculas de MHC de Clase I o Clase II, para tratar o prevenir una infección viral, expandir células Breg específicas de antígeno, TC1, linfocitos auxiliares T CD4⁺ y/o linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y/o linfocitos de "memoria" de linfocitos T y linfocitos B autorreguladores, generados por enfermedad. La respuesta también puede implicar la activación de otros componentes.

Las expresiones "respuesta inflamatoria" e "inflamación", como se usan en el presente documento, indican la respuesta biológica compleja de los tejidos vasculares de un individuo a estímulos perjudiciales, tales como patógenos, células dañadas o agentes irritantes, e incluyen la secreción de citoquinas y más particularmente de citoquinas proinflamatorias, es decir, citoquinas que son producidas predominantemente por células inmunes activadas y están involucradas en la amplificación de reacciones inflamatorias. Las citoquinas proinflamatorias a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , IL-17, IL21, IL23, IL27 y TGF- β . Las inflamaciones a modo de ejemplo incluyen inflamación aguda e inflamación crónica. La inflamación aguda indica un proceso a corto plazo caracterizado por los signos clásicos de inflamación (hinchazón, enrojecimiento, dolor, calor y pérdida de funcionalidad) debido a la infiltración de los tejidos por plasma y leucocitos. Una inflamación aguda generalmente se produce siempre que el estímulo dañino está presente y cesa una vez que el estímulo se ha eliminado, descompuesto o aislado por la cicatrización (fibrosis). La inflamación crónica indica una afección caracterizada por una inflamación activa concurrente, destrucción de tejidos e intentos de reparación. La inflamación crónica no se caracteriza por los signos clásicos de inflamación aguda mencionados anteriormente. En cambio, el tejido inflamado crónicamente se caracteriza por la infiltración de células inmunes mononucleares (monocitos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas), destrucción tisular, e intentos de curación, que incluyen angiogénesis y fibrosis. Una inflamación se puede inhibir en el sentido de la presente divulgación afectando y en particular

inhibiendo cualquiera de los sucesos que forman la respuesta biológica compleja asociada con una inflamación en un individuo.

Un trastorno autoinmune puede incluir, entre otros, diabetes mellitus, pre-diabetes, rechazo de trasplantes, esclerosis múltiple, un trastorno relacionado con esclerosis múltiple, insuficiencia ovárica prematura, esclerodermia, enfermedad de Sjogren, lupus, vitíligo, alopecia (calvicie), insuficiencia poliglandular, enfermedad de Grave, hipotiroidismo, polimiositis, pénfigo, enfermedad de Crohn, colitis, hepatitis autoinmune, hipopituitarismo, miocarditis, enfermedad de Addison, enfermedades cutáneas autoinmunes, uveítis, anemia perniciosa, hipoparatiroidismo y/o artritis reumatoide. En ciertos aspectos, un componente peptídico de un complejo de antígeno/MHCII/partícula se obtiene a partir de o se diseña a partir de un autoantígeno o un epítipo de autoantígeno, o un mimético del mismo, implicado en la respuesta autoinmune que se va a investigar, modular o atenuar con el tratamiento. En aspectos particulares, el autoantígeno es un péptido, carbohidrato o lípido. En ciertos aspectos, un autoantígeno es un fragmento, epítipo o péptido de una proteína, carbohidrato o lípido expresado por ciertas células de un sujeto, tales como las células beta pancreáticas, e incluye, pero no se limita a, un fragmento de IGRP, insulina, proteína GAD o IA-2. Se han identificado varias de proteínas o epitopos de ese tipo para una diversidad de afecciones autoinmunes. El autoantígeno puede ser un péptido, carbohidrato, lípido o similar obtenido a partir de un segundo componente endocrino o neurocrino, tal como una célula de Schwann en los peri-islotos o similar.

Como se usa en el presente documento, la expresión antígeno "relevante para la enfermedad" se refiere a un antígeno o fragmento del mismo seleccionado para tratar una enfermedad seleccionada. Por ejemplo, un antígeno relevante para la diabetes es un antígeno o fragmento del mismo que tratará la diabetes. Se selecciona un antígeno relevante para la MS para tratar la MS. Para tratar la MS podría no seleccionarse un antígeno relevante para la diabetes. De manera similar, un antígeno relacionado con la autoinmunidad es un antígeno que es relevante para una enfermedad autoinmune y podría no seleccionarse para el tratamiento de un trastorno o enfermedad diferente a la autoinmunidad, por ejemplo, cáncer.

Como se usa en el presente documento, el término "diabetes" se refiere a un trastorno variable del metabolismo de los carbohidratos causado por una combinación de factores hereditarios y ambientales y generalmente se caracteriza por una secreción o uso inadecuado de insulina, por una producción excesiva de orina, por cantidades excesivas de azúcar en sangre y orina, y por sed, hambre y pérdida de peso. La diabetes se caracteriza por diabetes de Tipo 1 y diabetes de Tipo 2. El ratón diabético no obeso ("NOD") es un modelo animal aceptado para el estudio y tratamiento de la diabetes. La diabetes de Tipo 1 (T1D) en ratones se asocia con linfocitos T CD8⁺ autorreactivos. Los ratones diabéticos no obesos (NOD) desarrollan una forma de T1D, muy parecida a la T1D humana, que resulta de la destrucción selectiva de las células β pancreáticas por linfocitos T que reconocen un listado creciente de autoantígenos. Aunque el inicio de la T1D requiere claramente la contribución de los linfocitos CD4⁺, hay pruebas convincentes de que la T1D es dependiente de los linfocitos T CD8⁺. Se ha descubierto que una fracción significativa de los linfocitos CD8⁺ asociados a los islotes en ratones NOD usan TCRs de V α 17-J α 42+ invariantes para CDR3, denominados 'similares a 8.3-TCR'. Estas células, que reconocen el mimótopo NRP-A7 (definido usando bibliotecas peptídicas combinatorias) en el contexto de la K^d de la molécula de MHC, ya son un componente significativo de los primeros infiltrados de CD8⁺ en los islotes de NOD, son diabetogénicos y se dirigen a un péptido de proteína relacionada con la subunidad catalítica de glucosa-6-fosfatasa específica de islotes (IGRP), una proteína de función desconocida. Los linfocitos CD8⁺ que reconocen este péptido (IGRP₂₀₆₋₂₁₄, similar a NRP-A7) son inusualmente frecuentes en la circulación (> 1/200 linfocitos CD8⁺). En particular, la progresión de la insulinitis a la diabetes en ratones NOD va acompañada invariablemente por la expansión cíclica de la combinación de linfocitos CD8⁺ reactivos para IGRP₂₀₆₋₂₁₄, y por una ávida maduración de su homólogo asociado a los islotes. Más recientemente, se ha demostrado que los linfocitos CD8⁺ asociados a los islotes en ratones NOD reconocen múltiples epítipos de IGRP, lo que indica que IGRP es un autoantígeno dominante para los linfocitos CD8⁺, al menos en la T1D de murino. Los linfocitos CD8⁺ asociados a los islotes en NOD, en particular los que se encuentran temprano en el proceso de la enfermedad también reconocen un epítipo de insulina (Ins B₁₅₋₂₃).

Los estudios de asociación han sugerido que ciertos alelos de HLA de clase I (es decir, HLA-A*0201) proporcionan susceptibilidad a la T1D humana. Los estudios de patología han mostrado que las lesiones de insulinitis en pacientes recién diagnosticados consisten principalmente en linfocitos T CD8⁺ (restringidos a HLA de clase I), que también son la población celular predominante en pacientes tratados mediante trasplante con isoinjertos de páncreas (de gemelos idénticos) o aloinjertos (de donantes relacionados).

La insulina es una diana fundamental del anticuerpo y la respuesta de CD4⁺ en la T1D tanto el ser humano como en murino. El epítipo de la cadena de insulina B humana, hInsB₁₀₋₁₈, se presenta por HLA-A*0201 a linfocitos CD8⁺ autorreactivos tanto en receptores de trasplantes de islotes como en el curso de una enfermedad espontánea. Además, se han identificado cuatro péptidos adicionales de pre-proinsulina 1 o 2 de ratón que son reconocidos por los linfocitos T CD8⁺ asociados a los islotes de ratones transgénicos HLA-A*0201 en el contexto de HLA-A*0201.

Como se usa en el presente documento, el término "pre-diabetes" se refiere a un periodo asintomático que precede a una afección diabética caracterizada por daño de células beta subclínicas en el que el paciente presenta niveles normales de glucosa en plasma. También se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos de células de los islotes (los ICA) y, cuando está cerca del inicio de los síntomas clínicos, puede ir acompañada de intolerancia a la

glucosa.

Como se usa en el presente documento, la expresión "esclerosis múltiple" o "MS" se refiere al trastorno autoinmune en el que el sistema inmunológico del cuerpo consume la vaina protectora que cubre los nervios. Esto interfiere con la comunicación entre el cerebro y el resto del cuerpo. Por último, esto puede dar como resultado el deterioro de los nervios, un proceso que no es reversible.

Como se usa en el presente documento, la expresión "trastorno relacionado con la esclerosis múltiple" se refiere a un trastorno que se presenta conjuntamente con una susceptibilidad a la MS o con MS. Los ejemplos no limitantes de los mismos incluyen neuromielitis óptica (NMO), uveítis, esclerosis con dolor neuropático, aterosclerosis, arteriosclerosis, esclerosis diseminada, esclerosis sistémica, MS espino-óptica, MS progresiva primaria (PPMS) y MS sistémica recurrente, esclerosis sistémica progresiva y esclerosis atáxica.

Los términos "epítipo" y "determinante antigénico" se usan indistintamente para hacer referencia a un sitio en un antígeno al que los linfocitos B y/o T responden o reconocen. Los epítipos de linfocitos B se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos como aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen generalmente en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario se pierden generalmente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo generalmente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-20 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítipos incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Glenn E. Morris, Epitope Mapping Protocols (1996). Los linfocitos T reconocen epítipos continuos de aproximadamente nueve aminoácidos para linfocitos CD8 o aproximadamente 13-15 aminoácidos para linfocitos CD4. Los linfocitos T que reconocen el epítipo se pueden identificar mediante ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígeno, tal como se determina mediante la incorporación de ³H-timidina mediante linfocitos T cebados como respuesta a un epítipo (Burke *et al.*, J. Inf. Dis., 170: 1110-1119, 1994), por destrucción dependiente de antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos, Tigges *et al.*, J. Immunol., 156 (10): 3901-3910, 1996) o por secreción de citoquinas. La presencia de una respuesta inmunológica mediada por células se puede determinar mediante ensayos de proliferación (linfocitos T CD4⁺) o ensayos de CTL (linfocitos T citotóxicos).

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

Como se usa en el presente documento, los términos "paciente" y "sujeto" se usan 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 usado comúnmente en un laboratorio a cómo un ratón, rata, simio, canino, felino, bovino, equino u ovino.

Como se usa en la presente solicitud, el término "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es recombinante o que se ha aislado sin ácido nucleico genómico total. Dentro del término "polinucleótido" están incluidos oligonucleótidos (ácidos nucleicos con una longitud de 100 restos o menos), vectores recombinantes, que incluyen, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus y similares. Los polinucleótidos incluyen, en ciertos aspectos, secuencias reguladoras, aisladas básicamente de sus genes de origen natural o secuencias codificantes de 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 ácidos nucleicos contigua que codifica todo o una parte de dicho polipéptido de las siguientes longitudes: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 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 de una especie dada puede estar codificado por ácidos nucleicos que contienen variaciones naturales que tienen secuencias de ácidos nucleicos ligeramente diferentes pero, sin embargo, codifican la misma proteína o polipéptido o péptido o básicamente los que son similares.

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

El término "aislado" o "recombinante", como se usa en el presente documento con respecto a ácidos nucleicos, tales como ADN o ARN, se refiere a moléculas separadas de otros ADN o ARN, respectivamente, que están presentes en la fuente natural de la macromolécula así como en los polipéptidos. La expresión "ácido nucleico aislado o

recombinante" pretende incluir fragmentos de ácido nucleico que no se producen de manera natural como fragmentos y que podrían no encontrarse en el estado natural. El término "aislado" también se usa en el presente documento para hacer referencia a polinucleótidos, polipéptidos y proteínas que se aíslan de otras proteínas celulares y se pretende que incluya tanto los polipéptidos purificados como los recombinantes. En otras realizaciones, la expresión "aislado o recombinante" se refiere a separado de los componentes, celulares y de otro tipo, en los cuales la célula, tejido, polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, 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 de tejidos o células de fenotipo o genotipo diferente. Un polinucleótido aislado se separa de los nucleótidos contiguos en las posiciones 3' y 5' con los que normalmente está asociado en su entorno nativo o natural, por ejemplo, en el cromosoma. Como es evidente para los expertos en la materia, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento(s) de los mismos de origen no natural, no requiere "aislamiento" para distinguirlo de su homólogo de origen natural.

Un polinucleótido o región polinucleotídica (o un polipéptido o región polipeptídica) que tiene un cierto porcentaje (por ejemplo, un 80 %, un 85 %, un 90 %, o un 95 %) de "identidad de secuencia" con otra secuencia se refiere a que, cuando está alineada, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) es el mismo cuando se comparan las dos secuencias. El alineamiento y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo los que se describen en *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds. 1987) Suplemento 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1. Preferentemente, para alineamiento se usan parámetros por defecto. Un programa de alineamiento preferente es BLAST, que usa parámetros por defecto. En particular, los programas preferentes son BLASTN y BLASTP, que usan los siguientes parámetros por defecto: Código genético = estándar; filtro = ninguno; hebra = ambas; corte = 60; espera = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripción = 50 secuencias; clasificación por = ALTA PUNTUACIÓN; Bases de datos = no redundante, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traducciones de CDS de GenBank + SwissProtein + SPupdate + PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente dirección de Internet: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST.

Sin mención explícita y, a menos que se pretenda lo contrario, se debe deducir, que cuando la presente divulgación se refiere a un antígeno, polipéptido, proteína, polinucleótido o anticuerpo, se pretende un equivalente o un equivalente biológico de los mismos dentro del alcance de la presente divulgación. Como se usa en el presente documento, la expresión "equivalente biológico del mismo" pretende ser sinónimo de "equivalente del mismo" cuando se refiere a un antígeno, proteína, anticuerpo, fragmento, polipéptido o ácido nucleico, de referencia, y se pretende que tengan una homología mínima, mientras que aún se mantiene la estructura o funcionalidad deseada. A menos que se indique de forma específica de otro modo, se contempla que cualquier polinucleótido, polipéptido o proteína mencionado en el presente documento también incluya equivalentes de los mismos. En un aspecto, un polinucleótido equivalente es uno que se hibrida en condiciones rigurosas al polinucleótido o complemento del polinucleótido como se describe en el presente documento para su uso en los métodos descritos. En otro aspecto, un anticuerpo equivalente o un polipéptido de unión a antígeno se refiere a uno que se une con una afinidad de al menos un 70 %, o alternativamente al menos un 75 %, o alternativamente al menos un 80 %, o alternativamente al menos un 85 %, o alternativamente al menos un 90 %, o alternativamente al menos un 95 % o una afinidad más elevada a un anticuerpo o fragmento de unión antígeno de referencia. En otro aspecto, el equivalente del mismo compite con la unión del anticuerpo o fragmento de unión antígeno a su antígeno en un ensayo de ELISA competitivo. En otro aspecto, un equivalente pretende una homología o identidad de al menos un 80 % hoy alternativamente, un porcentaje de homología o identidad de al menos aproximadamente un 85 %, o alternativamente al menos aproximadamente un 90 %, o alternativamente al menos aproximadamente un 95 %, o alternativamente un 98 % y presenta una actividad biológica básicamente equivalente con respecto a la proteína, polipéptido o ácido nucleico de referencia.

"Hibridación" se refiere a una reacción en la que uno o más polinucleótidos reaccionan para formar un complejo que se estabiliza mediante formación de enlaces de hidrógeno entre las bases de los restos de nucleótidos. El enlace de hidrógeno se puede producir por emparejamiento de bases de Watson-Crick, unión de Hoogsteen, o de cualquier otra manera específica de secuencia. El complejo puede comprender dos hebras que forman una estructura híbrida, tres o más hebras que forman un complejo de múltiples hebras, una única hebra de auto-hibridación, o cualquier combinación de estas. Una reacción de hibridación puede constituir una etapa en un proceso más amplio, tal como el inicio de una reacción de PC, o la escisión enzimática de un polinucleótido por una ribozima.

Los 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 un 0 % a aproximadamente un 25 %; y soluciones de lavado de aproximadamente 4x SSC a aproximadamente 8x SSC. Los ejemplos de condiciones de hibridación moderadas incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C; concentraciones tampón de aproximadamente 9x SSC a aproximadamente 2x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 50 %; y soluciones de lavado de aproximadamente 5x SSC a aproximadamente 2x SSC. Los ejemplos de condiciones de alta rigurosidad incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 68 °C; concentraciones tampón de aproximadamente 1x SSC a aproximadamente 0,1x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente un 55 % a aproximadamente un 75 %; y soluciones de lavado de aproximadamente 1x SSC, 0,1x SSC, o agua

desionizada. En general, los tiempos de incubación de hibridación son de 5 minutos a 24 horas, con 1, 2 o más etapas de lavado, y los tiempos de incubación de lavado son aproximadamente 1, 2 o 15 minutos. SSC es NaCl 0,15 M y tampón citrato 15 mM. Se entiende que se pueden usar equivalentes de SSC que usan otros sistemas de tampón.

5 "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 con 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 de un 40 %, o alternativamente una identidad de menos de un 25 %, con una de las secuencias de la presente divulgación.

15 "Homología" o "identidad" o "similitud" también pueden hacer referencia a dos moléculas de ácido nucleico que se hibridan en condiciones rigurosas.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y similares se usan en el presente documento para hacer referencia a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para un trastorno y/o un efecto adverso atribuible al trastorno. En un aspecto, el tratamiento indica una reducción en los signos de la enfermedad usando una escala establecida.

IGRP, que está codificado por un gen (situado en el cromosoma 2q28-32 que se solapa a un locus de susceptibilidad de T1D, IDDM7 (2q31), también se ha identificado recientemente como un autoantígeno de células beta de posible relevancia en la T1D humana. Dos epítomos de unión a HLA-A*0201 de IGRP humano (hIGRP₂₂₈₋₂₃₆ y hIGR-P₂₆₅₋₂₇₃) son reconocidos por linfocitos CD8⁺ asociados a los islotes de ratones NOD con deficiencia de MHC de clase I de murino, que expresan un transgén HLA-A*0201. Los ejemplos no limitantes de antígenos de IGRP que se unen a la molécula de MHC de clase II de murino (IAg7) incluyen por ejemplo, IGRP₂₀₆₋₂₁₄, que comprende el péptido antigénico VYLKTNVFL e IGRP₄₋₂₂, que comprende el péptido antigénico LHRSGVLIHHLQEDYRTY o un equivalente del mismo, e IGRP₁₂₈₋₁₄₅, que comprende el material péptido antigénico TAALSYTISRMEESSVTL o un equivalente del mismo.

35 "Para prevenir" hace referencia a prevenir un trastorno o efecto *in vitro* o *in vivo* en un sistema o sujeto que está predispuesto al trastorno o efecto.

Una "composición" pretende hacer referencia a una combinación de agente activo y otro compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente o marcador detectable) o activo, tal como un adyuvante. En ciertas realizaciones, la composición no contiene un adyuvante.

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

45 La expresión "codón funcionalmente equivalente" se usa en el presente documento para hacer referencia a codones que codifican el mismo aminoácido, tales como los seis codones para arginina o serina, y también se refiere a codones que codifican aminoácidos biológicamente equivalentes (véase la Tabla que sigue a continuación).

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

Como se usa en el presente documento, una "proteína" o "polipéptido" o "péptido" se refiere una molécula que comprende al menos cinco restos de aminoácido.

- 5 Otros objetos, características y ventajas llegarán a ser evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, se debería entender que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención reivindicada, se proporcionan solamente a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada llegarán a ser evidentes para las personas con experiencia en la materia a la que pertenece la presente descripción.

10

II. REALIZACIONES DESCRIPTIVAS

En la actualidad no hay una plataforma terapéutica que permita la supresión completa de las respuestas policlonales autoinmunes sin comprometer la inmunidad sistémica. La divulgación del solicitante que se describe en el presente documento permite el diseño de medicamentos específicos de enfermedad autoinmune que convierten los linfocitos T CD4⁺ y los linfocitos B específicos de enfermedad autorreactiva en linfocitos T CD4⁺ y linfocitos B reguladores mono-específicos, afines que suprimen de manera coordinada todas las otras respuestas de los linfocitos T y B autorreactivos del hospedador, independientemente de su fina especificidad antigénica y, sin embargo, con una especificidad de enfermedad exquisita y sin alterar la inmunidad sistémica.

15

20

La complejidad autoantigénica de la Diabetes de Tipo 1 (T1D)

La T1D está causada por una respuesta autoinmune crónica que erosiona progresivamente la masa de células beta pancreáticas. La destrucción de linfocitos B tanto en seres humanos como en ratones NOD se efectúa mediante linfocitos T que reconocen muchos autoantígenos (Tsai, S. *et al.*, (2008) *Adv. Immunol.* 100: 79-124; Lieberman, S. *et al.*, (2003) *Tissue Antigens* 62: 359-377). Aunque la secuencia precisa de sucesos permanece mal definida, la evidencia actual sugiere que la T1D requiere linfocitos CD4⁺ y CD8⁺; que los linfocitos T autorreactivos se diferencian en citolíticos al atacar a los antígenos de linfocitos B en las APC locales; y que estos linfocitos T se dirigen a un amplio repertorio de autoantígenos (Tsai, S. *et al.*, (2008) *Adv. Immunol.* 100: 79-124; Santamaria, P. (2010) *Immunity* 32: 437-445).

25

30

Se ha mostrado que los péptidos solubles pueden inducir tolerancia de linfocitos T específicos de péptidos *in vivo*, pero no pueden atenuar las respuestas autoinmunes poliespecíficas (Han *et al.*, (2005) *Nature Medicine* 11(6):645-652). Inesperadamente, se encontró que, a diferencia de la terapia con péptidos solubles, la terapia con las NP revestidas con un solo pMHC de clase I relevante para T1D (usado originalmente como control negativo) atenúa la progresión de la T1D en ratones NOD pre-diabéticos y restauraba la normoglucemia en animales diabéticos (Tsai, S. *et al.*, (2010) *Immunity* 32: 568-580). El trabajo posterior condujo al descubrimiento inesperado de que la terapia con pMHC-NP funciona al expandir, de manera específica para el epítipo, los linfocitos CD8⁺ autorreactivos experimentadas por el autoantígeno que suprimieron que suprimieron el reclutamiento de otras especificidades de linfocitos T autoantigénicos al inhibir y eliminar las APC cargadas con autoantígeno. Más recientemente, el Solicitante ha encontrado que esta plataforma terapéutica se puede aprovechar para la expansión *in vivo* de linfocitos CD4⁺ reguladores de linfocitos T autorreactivos. De forma específica, el Solicitante descubrió que las NP revestidas con pMHC de clase II relevantes para T1D individuales expanden los linfocitos T CD4⁺ TR1 específicos de enfermedad, expresando los marcadores CD49b y LAG3 de TR1 (Gagliani, N. *et al.*, (2013) *Nature Medicine* 19: 739-746) y producción de las citoquinas IL10 y TGF- β (véase a continuación).

35

40

45

De manera colectiva, estas observaciones apoyan un nuevo paradigma en la progresión de la autoinmunidad, afirmando que la estimulación crónica de los linfocitos T CD8⁺ o CD4⁺ autorreactivos sin tratamiento previo por epítopos endógenos desencadena su diferenciación en linfocitos T reguladores autorreactivos de tipo memoria; y

que estos linfocitos reguladores autorreactivos de memoria suprimen la activación de las especificidades de los linfocitos T autorreactivos de alta avidéz homólogos y no homólogos mediante la supresión y/o destrucción de las APC cargadas con autoantígenos (Tsai, S. *et al.*, (2010) *Immunity* 32: 568-580). Es importante destacar que, sin limitarse a la teoría, se puede usar cualquier especificidad de epítipo único (pMHC) implicada en una enfermedad autoinmune (entre muchas), cuando se reviste como un ligando sobre las NP, para atenuar las respuestas autoinmunes complejas. El Solicitante cree que estas preparaciones de NP no pueden activar los linfocitos T sin tratamiento previo, por lo que inducen respuestas de linfocitos T efectoras, porque carecen de moléculas coestimuladoras fundamentales, tales como CD80 y CD86. De hecho, este enfoque produce una delección de las células autorreactivas sin tratamiento previo y efectoras homólogas. Por lo tanto, el enfoque terapéutico que permitió su descubrimiento proporcionó una plataforma para una nueva clase de agentes terapéuticos en autoinmunidad, potencialmente capaces de resolver las respuestas autoinmunes policlonales de una manera específica de enfermedad y órgano sin comprometer la inmunidad sistémica.

III. MÉTODOS

También se proporcionan métodos médicos y de diagnóstico. En un aspecto, se proporciona un método para estimular la formación, expansión y reclutamiento de linfocitos B reguladores y/o linfocitos TR1 (por ejemplo, linfocitos TR1 y CD4⁺) de una manera específica de antígeno en un sujeto que lo necesite, que comprende, o alternativamente que consiste básicamente en, o aún más que consiste en, administrar al sujeto una cantidad eficaz del complejo o composición de NP como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, se proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno autoinmune como se describe en el presente documento, por ejemplo, MS, trastorno relacionado con MS, diabetes o pre-diabetes, en un sujeto que lo necesite, el método comprendiendo, o alternativamente consistiendo básicamente en, o aún más que consiste en, administrar al sujeto una cantidad eficaz del complejo o composición de NP como se describe en el presente documento, en el que el autoantígeno es relevante para la enfermedad que se va a tratar, por ejemplo, para la prevención o el tratamiento de diabetes, el antígeno es un antígeno relevante para la diabetes. En un aspecto adicional, la enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple o un trastorno relacionado con la esclerosis múltiple y el antígeno es relevante para la MS.

Los antígenos peptídicos para el tratamiento o la prevención de pre-diabetes o diabetes, incluyen, pero no se limitan a, hInsB₁₀₋₁₈ (HLVEALYLV), hIGRP₂₂₈₋₂₃₆ (LNIDLLWSV), hIGRP₂₆₅₋₂₇₃ (VLFGLGFAL), IGRP₂₀₆₋₂₁₄ (VYLKTNVFL), NRP-A7 (KYNKANAF), NRP-I4 (KYNIANVFL), NRP-V7 (KYNKANVFL), YAI/D^b (FQDENLYL) y/o INS B₁₅₋₂₃ (LYLVCGER), GAD65₁₁₄₋₁₂₃, VMNILLQYVV; GAD65₅₃₆₋₅₄₅, RMMYEGTTMV; GFAP₁₄₃₋₁₅₁, NLAQTDLATV; GFAP₂₁₄₋₂₂₂, QLARQQVHV; IA-2₁₇₂₋₁₈₀, SLSPLQAE; IA-2₄₈₂₋₄₉₀, SLAAGVKLL; IA-2₈₀₅₋₈₁₃, VIVMLTPLV; pplAPP₅₋₁₃, KLQVFLIVL; pplAPP₉₋₁₇, FLIVLSVAL; IGRP₁₅₂₋₁₆₀, FLWSVFMLI; IGRP₂₁₁₋₂₁₉, NLFLFLFAV; IGRP₂₁₅₋₂₂₃, FLFAVGFLY; IGRP₂₂₂₋₂₃₀, YLLLRVLNI; IGRP₂₂₈₋₂₃₆, LNIDLLWSV; IGRP₂₆₅₋₂₇₃, VLFGLGFAL; IGRP₂₉₃₋₃₀₁, RLLCALTS; Pro-insulina_{L2-10}, ALWMRLLPL; Pro-insulina_{L3-11}, LWMRLLPLL; Pro-insulina_{L6-14}, RLLPLLALL; Pro-insulina_{B5-14}, HLCGSHLVEA; Proinsulina_{B10-18}, HLVEALYLV; Pro-insulina_{B14-22}, ALYLVCGER; Pro-insulina_{B15-24}, LYLVCGERGF; Pro-insulina_{B17-25}, LVCGERGFF; Pro-insulina_{B18-27}, VCGERGFY; Proinsulina_{B20-27}, GERGFY; Pro-insulina_{B21-29}, ERGFYTPK; Pro-insulina_{B25-C1}, FYTPKTRRE; Pro-insulina_{B27-C5}, TPKTRREAEDL; Pro-insulina_{C20-28}, SLQPLALEG; Pro-insulina_{C25-33}, ALEGLQKR; Pro-insulina_{C29-A5}, SLQKRGIVEQ; Pro-insulina_{A1-10}, GIVEQCCTSI; Proinsulina_{A2-10}, IVEQCCTSI; Pro-insulina_{A12-20}, SLYQLENYC o equivalentes y/o combinaciones de los mismos. Los ejemplos adicionales incluyen ProIns 76-90, SLQPLALEGLQKRG, ProIns 79-89, PLALEGLQKR, ProIns 90-109, GIVEQCCTSICSLYQLENYC, ProIns 94-105, QCCTSICSLYQL, GAD 247-266, NMYAMMIARFKMFPEVKEKG, GAD 255-265, RFKMFPEVKEK, GAD 555-567, NFFRMVISNPAAT, IGRP 13-25, QHLQKDYRAYYTF, IGRP 8-27, GVLIQHLQKDYRAYYTFLN, ProIns B24-C36, FFYTPMSRREVED y equivalentes de cada uno de los mismos.

Cuando el método se refiere al tratamiento de la MS o trastornos relacionados con la MS, el complejo incluye antígenos relacionados con la esclerosis múltiple. Los antígenos de ese tipo incluyen, por ejemplo, los que se desvelan en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2012/0077686, y antígenos obtenidos a partir de proteína básica de mielina, glicoproteína asociada a mielina, proteína oligodendrocítica de mielina, proteína proteolipídica, oligoproteína de mielina oligodendrocítica, proteína oligodendrocítica básica asociada a mielina, proteína específica de oligodendrocitos, proteínas de choque térmico, proteínas específicas de oligodendrocitos NOGO A, glicoproteína Po, proteína de mielina periférica 22 y 2'3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa. En ciertas realizaciones, el antígeno se obtiene a partir de Glicoproteína Oligodendrocítica de Mielina (MOG). Los ejemplos no limitados incluyen, por ejemplo, MAG₂₈₇₋₂₉₅, SLLLEEEV; MAG₅₀₉₋₅₁₇, LMWAKIGPV; MAG₅₅₆₋₅₆₄, VLFSSDFRI; MBP₁₁₀₋₁₁₈, SLSRFSWGA; MOG₁₁₄₋₁₂₂, KVEDPFYVW; MOG₁₆₆₋₁₇₅, RTFDPHFLRV; MOG₁₇₂₋₁₈₀, FLRVPCWKI; MOG₁₇₉₋₁₈₈, KITLFVIVPV; MOG₁₈₈₋₁₉₆, VLGPLVALI; MOG₁₈₁₋₁₈₉, TLFVIVPV; MOG₂₀₅₋₂₁₄, RLAGQFLEEL; PLP₈₀₋₈₈, FLYGALLA o equivalentes o combinaciones de los mismos.

Los ejemplos adicionales no limitantes de antígenos que se pueden usar comprenden polipéptidos que comprenden, o alternativamente que consisten básicamente en, o aún más que consisten en, los polipéptidos del grupo: MOG₃₅₋₅₅, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; MOG₃₆₋₅₅, EVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; MAG₂₈₇₋₂₉₅, SLLLEEEV; MAG₅₀₉₋₅₁₇, LMWAKIGPV; MAG₅₅₆₋₅₆₄, VLFSSDFRI; MBP₁₁₀₋₁₁₈, SLSRFSWGA; MOG₁₁₄₋₁₂₂, KVEDPFYVW; MOG₁₆₆₋₁₇₅, RTFDPHFLRV; MOG₁₇₂₋₁₈₀, FLRVPCWKI; MOG₁₇₉₋₁₈₈, KITLFVIVPV; MOG₁₈₈₋₁₉₆, VLGPLVALI; MOG₁₈₁₋₁₈₉,

TLFVIVPVL; MOG₂₀₅₋₂₁₄, RLAGQFLEEL; PLP₈₀₋₈₈, FLYGALLA, o un equivalente de cada uno de los mismos, o combinaciones de los mismos.

Los métodos para determinar y monitorizar la terapia son conocidos en la técnica y se describen brevemente en el presente documento. Cuando se administra *in vitro*, la administración es mediante el contacto de la composición con el tejido o la célula mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, mediante la administración a un medio de cultivo celular o tisular, y es útil como una identificación sistemática para determinar si la terapia es adecuada para un individuo o para identificar sistemáticamente terapias alternativas que se van a usar como un sustituto o en combinación con las composiciones que se desvelan. 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 identificar sistemáticamente terapias alternativas que se van a usar como un sustituto o en combinación con las composiciones que se desvelan antes de la administración en seres humanos. En un mamífero humano o no humano, también son útiles para tratar la enfermedad o trastorno.

Los métodos que se han mencionado anteriormente requieren administración de una cantidad eficaz de un complejo de NP.

El MHC del complejo de antígeno-MHC-nanopartícula puede ser MHC I, MHC II, o MHC no clásico pero preferentemente MHCII. En el presente documento se describen proteínas de MHC. 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 MHC del complejo de antígeno-MHC-nanopartícula es MHC de clase II o una molécula de MHC no clásica como se describe en el presente documento. En un aspecto, el antígeno comprende, o alternativamente consiste básicamente en, o aún más consiste en, el polipéptido GWYRSPFSRVVH o un equivalente de GWYRSPFSRVVH.

El tamaño de la nanopartícula puede variar de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1 μm . En ciertas realizaciones, la nanopartícula tiene un diámetro inferior a aproximadamente 1 μm . En otras realizaciones, la nanopartícula tiene un diámetro inferior a aproximadamente 500 nm, inferior a aproximadamente 400 nm, inferior a aproximadamente 300 nm, inferior a aproximadamente 200 nm, inferior a aproximadamente 100 nm, o inferior a aproximadamente 50 nm. 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 tiene un diámetro 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 tiene un diámetro inferior a aproximadamente 1 μm o alternativamente inferior a 100 nm. En otras realizaciones, el complejo tiene un diámetro inferior a aproximadamente 500 nm, inferior a aproximadamente 400 nm, inferior a aproximadamente 300 nm, inferior a aproximadamente 200 nm, inferior a aproximadamente 100 nm, o inferior a aproximadamente 50 nm. En realizaciones adicionales, el complejo tiene un diámetro de aproximadamente 5 nm o 10 nm a aproximadamente 50 nm, o de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 75 nm, o de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 50 nm, o de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 60 nm, o de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 60 nm, en un aspecto aproximadamente 55 nm.

El solicitante ha descubierto que la densidad de los complejos de antígeno-MHC en la nanopartícula contribuye al beneficio terapéutico. Por lo tanto, como se desvela en el presente documento, el complejo de antígeno-nanopartícula de MHC puede tener una densidad definida en el intervalo de aproximadamente 0,05 moléculas de MHC por 100 nm^2 de área superficial de la nanopartícula incluyendo el complejo, suponiendo al menos 2 MHC, 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, MHC formando complejo con la nanopartícula. En un aspecto el complejo tiene una densidad de MHC de aproximadamente 0,01 MHC por 100 nm^2 (0,05 MHC/100 nm^2) a aproximadamente 30 MHC/100 nm^2 , o alternativamente de 0,1 MHC/100 nm^2 a aproximadamente 25 MHC/100 nm^2 , o alternativamente de aproximadamente 0,3 MHC/100 nm^2 a aproximadamente 25 MHC/100 nm^2 , o alternativamente de aproximadamente 0,4 MHC/100 nm^2 a aproximadamente 25 MHC/100 nm^2 , o alternativamente de aproximadamente 0,5 MHC/100 nm^2 a aproximadamente 20 MHC/100 nm^2 , o alternativamente de 0,6 MHC/100 nm^2 a aproximadamente 20 MHC/100 nm^2 , o alternativamente de aproximadamente 1,0 MHC/100 nm^2 a aproximadamente 20 MHC/100 nm^2 , o alternativamente de aproximadamente 5,0 MHC/100 nm^2 a aproximadamente 20 MHC/100 nm^2 , o alternativamente de aproximadamente 10,0 MHC/100 nm^2 a aproximadamente 20 MHC/100 nm^2 , o alternativamente de aproximadamente 15 MHC/100 nm^2 a aproximadamente 20 MHC/100 nm^2 , 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^2 . En un aspecto, cuando 9 o al menos 9 MHC forman complejos con una nanopartícula, el intervalo de densidades es de aproximadamente 0,3 MHC/100 nm^2 a aproximadamente 20 MHC/100 nm^2 .

En uno de sus aspectos del método, se proporciona un método para acumular linfocitos B reguladores y/o linfocitos

T antiinflamatorios en un paciente que lo necesite. 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 básicamente en, o aún más consiste en administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz del complejo de antígeno-nanopartículas MHC como se describe en el presente documento.

En una realización, las composiciones y métodos que se describen en el presente documento son para tratar un trastorno autoinmune tal como MS, trastorno asociado a MS, diabetes o pre-diabetes. El método comprende, consiste básicamente en, o aún más consiste en administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz del complejo de antígeno-nanopartículas MHCII como se describe en el presente documento.

Los detalles con respecto a modos de administración *in vitro* e *in vivo* se describen por la presente.

La presente divulgación también proporciona el uso de complejos de NP para la preparación de medicamentos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades y trastornos como se describe en el presente documento.

IV. COMPLEJOS DE ANTÍGENO-MHC-NANOPARTÍCULA

A. Polipéptidos y Polinucleótidos

Los aspectos adicionales se refieren a un antígeno polipeptídico aislado o purificado, que comprende, o que consiste básicamente en, o aún más que consiste en, las secuencias de aminoácidos como se describe en el presente documento, o un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 80 %, o alternativamente al menos 85 %, o alternativamente al menos un 90 %, o alternativamente al menos un 95 %, o alternativamente al menos un 98 % con respecto a las secuencias de aminoácidos de los antígenos, o polipéptidos codificados por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de aproximadamente un 80 %, una o alternativamente identidad de secuencia al menos un 85 %, o alternativamente al menos un 90 %, o alternativamente al menos un 95 %, o alternativamente al menos un 98 % con respecto al polinucleótido que codifica las secuencias de aminoácidos del antígeno, o su complemento, o un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de rigurosidad moderada a elevada a un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de los antígenos, o su complemento. También se proporcionan polinucleótidos aislados y purificados que codifican los polipéptidos antigénicos que se desvelan en el presente documento, o aminoácidos que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 80 % con los mismos, o una identidad de secuencia alternativamente de al menos un 85 %, o alternativamente al menos un 90 %, o alternativamente al menos un 95 %, o alternativamente al menos un 98 % con las secuencias que se desvelan, o un equivalente, o un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con el polinucleótido, su equivalente o su complemento y los polipéptidos aislados o purificados codificados por estos polinucleótidos. Los polipéptidos y polinucleótidos se pueden combinar con sustancias de origen no natural con las cuales no se asocian en la naturaleza, por ejemplo, vehículos, vehículos farmacéuticamente aceptables, vectores y moléculas de MHC, nanopartículas como se conoce en la técnica y como se describe en el presente documento.

Los antígenos, incluyendo segmentos, fragmentos y otras moléculas obtenidas a partir de una especie antigénica, que incluyen pero no se limitan a, péptidos, carbohidratos, lípidos u otras moléculas presentadas por moléculas de MHC clásicas y no clásicas generalmente se presentan formando complejos o se acoplan de forma operativa a una molécula de MHC o un derivado de la misma. El reconocimiento de antígenos por los linfocitos T está limitado por el complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). Un linfocito T dado reconocerá un antígeno solo cuando se una a una molécula de MHC particular. En general, los linfocitos T se estimulan solo en presencia de moléculas de auto-MHC, y el antígeno se reconoce como fragmentos del antígeno unido a moléculas de MHC propias. La restricción de MHC define la especificidad de los linfocitos T en términos del antígeno reconocido y en términos de la molécula de MHC que se une a su fragmento o fragmentos antigénico(s). En aspectos particulares, ciertos antígenos se emparejarán con ciertas moléculas de MHC o polipéptidos obtenidos a partir de las mismas.

La expresión "acoplado de forma operativa" o "revestido" como se usa en el presente documento, se refiere a una situación en la que los componentes polipeptídicos individuales (por ejemplo, MHC) y antigénicos (por ejemplo, péptidos) se combinan para formar el complejo activo antes de la unión en el sitio diana, por ejemplo, una célula inmune. Esto incluye la situación en la que los componentes del complejo polipeptídico individual 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 un polipéptido quimérico o de fusión (es decir, cada componente proteico discreto del complejo está contenido en una única cadena polipeptídica) se sintetiza o se expresa de forma recombinante como un complejo intacto. Generalmente, los complejos polipeptídicos se añaden a las nanopartículas para producir nanopartículas con complejos polipeptídicos adsorbidos o acoplados que tienen una proporción de número de moléculas:número de proporciones de nanopartículas de 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 habitualmente 0,1:1, 1:1 a 50:1 o 300:1. El contenido polipeptídico de las nanopartículas se puede determinar usando técnicas convencionales.

B. Moléculas de MHC

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

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

C. Componentes Antigénicos

Ciertas realizaciones incluyen métodos y composiciones relativas 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 conocida como antígenos. En particular, los segmentos antigénicos o fragmentos de determinantes antigénicos, que conducen a la destrucción de una célula a través de una respuesta autoinmune, se pueden identificar y usar para preparar un complejo de antígeno-MHC-nanopartículas que se describe en el presente documento. Las realizaciones incluyen composiciones y métodos para la modulación de una respuesta inmune en una célula o tejido del cuerpo.

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

Los ejemplos no limitantes de antígenos peptídicos incluyen, pero no se limitan a, hInsB₁₀₋₁₈ (HLVEALYLV), hIGRP₂₂₈₋₂₃₆ (LNIDLLWSV), hIGRP₂₆₅₋₂₇₃ (VLFGLGFAL), IGRP₂₀₆₋₂₁₄ (VYLKTNVFL), NRP-A7 (KYNKANAF), NRP-I4 (KYNIANVFL), NRP-V7 (KYNKANVFL), YAI/D^b (FQDENYLYL) y/o INS B₁₅₋₂₃ (LYLVCGERG), así como péptidos y proteínas que se desvelan en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2005/0202032 y equivalentes y/o combinaciones de los mismos.

En ciertos aspectos, un antígeno peptídico para tratamiento de T1D es GAD65₁₁₄₋₁₂₃, VMNILLQYVV; GAD65₅₃₆₋₅₄₅, RMMEYGTMMV; GFAP₁₄₃₋₁₅₁, NLAQTDLATV; GFAP₂₁₄₋₂₂₂, QLARQQVHV; IA-2₁₇₂₋₁₈₀, SLSPLQAEI; IA-2₄₈₂₋₄₉₀, SLAAGVKLL; IA-2₈₀₅₋₈₁₃, VIVMLTPLV; ppiAPP₅₋₁₃, KLQVFLVL; ppiAPP₉₋₁₇, FLIVLSVAL; IGRP₁₅₂₋₁₆₀, FLWSVFMLI; IGRP₂₁₁₋₂₁₉, NLFLFLFAV; IGRP₂₁₅₋₂₂₃, FLFAVGFYL; IGRP₂₂₂₋₂₃₀, YLLLRVLNI; IGRP₂₂₈₋₂₃₆, LNIDLLWSV; IGRP₂₆₅₋₂₇₃, VLFGLGFAL; IGRP₂₉₃₋₃₀₁, RLLCALTSI; Pro-insulina_{L2-10}, ALWMRLLPL; Pro-insulina_{L3-11}, LWMRLLPLL; Proinsulina_{L6}.

14, RLLPLLALL; Pro-insulina_{B5-14}, HLCGSHLVEA; Pro-insulina_{B10-18}, HLVEALYLV; Pro-insulina_{B14-22}, ALYLVCGER; Pro-insulina_{B15-24}, LYLVCGERGF; Proinsulina_{B17-25}, LVCGERGF; Pro-insulina_{B18-27}, VCGERGFY; Pro-insulina_{B20-27}, GERGFY; Pro-insulina_{B21-29}, ERGFYTPK; Pro-insulina_{B25-C1}, FYTPKTRRE; Pro-insulina_{B27-C5}, TPKTRREAEDL; Pro-insulina_{C20-28}, SLQPLALEG; Pro-insulina_{C25-33}, ALEGLQKR; Pro-insulina_{C29-A5}, SLQKRGIVEQ; Pro-insulina_{A1-10}, GIVEQCCTSI; Proinsulina_{A2-10}, IVEQCCTSI; Pro-insulina_{A12-20}, SLYQLENYC o equivalentes y/o combinaciones de los mismos.

Los ejemplos no limitantes adicionales de antígenos incluyen MS y los antígenos relevantes o relacionados con MS que se pueden usar comprenden polipéptidos que comprenden, o alternativamente que consisten básicamente en, o aún más que consisten en los polipéptidos del grupo: MOG₃₅₋₅₅, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; MOG₃₆₋₅₅, EVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; MAG₂₈₇₋₂₉₅, SLLLEEEV; MAG₅₀₉₋₅₁₇, LMWAKIGPV; MAG₅₅₆₋₅₆₄, VLFSSDFRI; MBP₁₁₀₋₁₁₈, SLSRFSWGA; MOG₁₁₄₋₁₂₂, KVEDPFYVW; MOG₁₆₆₋₁₇₅, RTFDPHFLRV; MOG₁₇₂₋₁₈₀, FLRVPCWKI; MOG₁₇₉₋₁₈₈, KITLFVIVPV; MOG₁₈₈₋₁₉₆, VLGPLVALI; MOG₁₈₁₋₁₈₉, TLFVIVPVL; MOG₂₀₅₋₂₁₄, RLAGQFLEEL; PLP₈₀₋₈₈, FLYGALLA, o un equivalente de cada uno de los mismos, o combinaciones de los mismos.

Además en aspectos adicionales, los antígenos peptídicos para el tratamiento de MS y trastornos relacionados con MS incluyen, pero no se limitan a: MOG₃₅₋₅₅, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; MOG₃₆₋₅₅, EVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; MAG₂₈₇₋₂₉₅, SLLLEEEV; MAG₅₀₉₋₅₁₇, LMWAKIGPV; MAG₅₅₆₋₅₆₄, VLFSSDFRI; MBP₁₁₀₋₁₁₈, SLSRFSWGA; MOG₁₁₄₋₁₂₂, KVEDPFYVW; MOG₁₆₆₋₁₇₅, RTFDPHFLRV; MOG₁₇₂₋₁₈₀, FLRVPCWKI; MOG₁₇₉₋₁₈₈, KITLFVIVPV; MOG₁₈₈₋₁₉₆, VLGPLVALI; MOG₁₈₁₋₁₈₉, TLFVIVPVL; MOG₂₀₅₋₂₁₄, RLAGQFLEEL; PLP₈₀₋₈₈, FLYGALLA MAG₂₈₇₋₂₉₅, SLLLEEEV; MAG₅₀₉₋₅₁₇, LMWAKIGPV; MAG₅₅₆₋₅₆₄, VLFSSDFRI, y equivalentes y/o combinaciones de los mismos.

Los antígenos ara el tratamiento de MS y trastornos relacionados con MS incluyen, los que se desvelan en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2012/0077686, y antígenos obtenidos a partir de proteína básica de mielina, glicoproteína asociada a mielina, proteína oligodendrocítica de mielina, proteína proteolípida, oligoproteína de mielina oligodendrocítica, proteína oligodendrocítica básica asociada a mielina, proteína específica de oligodendrocitos, proteínas de choque térmico, proteínas específicas de oligodendrocitos NOGO A, glicoproteína Po, proteína de mielina periférica 22 y 2'3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa. En ciertas realizaciones, el antígeno se obtiene a partir de Glicoproteína Oligodendrocítica de Mielina (MOG).

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

Las composiciones proteicas se pueden preparar mediante cualquier técnica conocida para las personas con experiencia en la materia, incluyendo (i) la expresión de proteínas, polipéptidos, o péptidos mediante técnicas convencionales de biología molecular, (ii) el aislamiento de compuestos proteicos a partir de fuentes naturales, o (iii) la síntesis química de materiales proteicos. Las secuencias de nucleótidos, así como de proteínas, polipéptidos y péptidos para diversos genes se han desvelado previamente, y se pueden encontrar en las bases de datos computarizadas reconocidas. Algunas bases de datos de ese tipo son las bases de datos GenBank y GenPept del National Center for Biotechnology Information (en la World Wide Web en ncbi.nlm.nih.gov/). La totalidad o parte de las regiones codificantes para estos genes se puede amplificar y/o expresar usando las técnicas que se desvelan en el presente documento o como podrían conocer las personas con experiencia en la materia.

Las variantes de secuencia de aminoácidos de epítomos autoantigénicos y otros polipéptidos de estas composiciones pueden ser variantes de sustitución, inserción o delección. Una modificación en un polipéptido 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,

186, 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 aminoácidos no contiguos o contiguos de un péptido o polipéptido, en comparación con el tipo silvestre.

Las variantes de delección generalmente carecen de uno o más restos de la secuencia de aminoácidos nativa o de tipo silvestre. Se puede producir la delección de restos individuales o se puede producir la delección de un número de aminoácidos contiguos. Se puede introducir un codón de parada (mediante sustitución o inserción) en una secuencia de ácidos nucleicos codificante para generar una proteína truncada. Los mutantes de inserción generalmente implican la adición de material en un punto no terminal en el polipéptido. Esto puede incluir la inserción de uno o más restos. También se pueden generar adiciones terminales, denominadas proteínas de fusión.

Las variantes de sustitución generalmente contienen el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y se pueden diseñar para modular una o más propiedades del polipéptido, con o sin la pérdida de otras funciones o propiedades. Las sustituciones pueden ser conservativas, es decir, un aminoácido se reemplaza con uno de forma y carga similares. Las sustituciones conservativas se conocen bien 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 conservativas, de modo que se vea afectada una función o actividad de un polipéptido o péptido, tal como la avidéz o afinidad hacia uno o más receptores celulares. Los cambios no conservativos generalmente implican la sustitución de un resto con uno que es químicamente diferente, tal como un aminoácido polar o cargado por un aminoácido no polar o no cargado, y viceversa.

Las proteínas pueden ser recombinantes o se pueden sintetizar *in vitro*. Alternativamente, una proteína recombinante se puede aislar a partir de bacterias u otra célula hospedadora.

También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos pueden incluir restos adicionales, tales como aminoácidos N o C terminales adicionales, o secuencias de ácidos nucleicos en las posiciones 5' o 3', respectivamente, y aún así seguir siendo esencialmente como se establece en una de las secuencias que se desvelan en el presente documento, siempre que la secuencia cumpla con los criterios que se han establecido anteriormente, incluyendo el mantenimiento de la actividad de la proteína biológica (por ejemplo, inmunogenicidad). La adición de secuencias terminales se aplica en particular a secuencias de ácidos nucleicos que pueden, por ejemplo, incluir diversas secuencias no codificantes que flanquean cualquiera de las partes en las posiciones 5' o 3' de la región codificante.

Se contempla que en composiciones que se desvelan en el presente documento, 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 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 los mismos). De esto, aproximadamente, al menos aproximadamente, o como máximo aproximadamente un 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, un 100 % puede ser complejo de antígeno-MHC-nanopartícula.

Además, la Patente de Estados Unidos N.º 4.554.101 (Hopp), enseña la identificación y preparación de epítomos a partir de secuencias de aminoácidos primarios basándose en la hidrofiliia. Mediante los métodos que se desvelan en Hopp, un experto en la materia podría ser capaz de identificar epítomos potenciales dentro de una secuencia de aminoácidos y confirmar su inmunogenicidad. También se han dedicado numerosas publicaciones científicas a la predicción de la estructura secundaria y la identificación de epítomos, a partir de análisis de secuencias de aminoácidos (Chou y 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 estos se puede usar, si se desea, para complementar las enseñanzas de Hopp en la Patente de los Estados Unidos N.º 4.554.101.

5 Para cualquier enfermedad autoinmune dada, el complejo de antígeno MHC se puede identificar y seleccionar previamente usando métodos conocidos en la técnica. Existen algoritmos - obtenidos a partir de un conjunto de péptidos alineados que se sabe que se unen a una molécula de MHC dada, que se pueden usar como indicador de tanto de unión de péptido-MHC y epítomos de linfocitos T. Véase, por ejemplo, Reche y Reinherz (2007) *Methods Mol. Biol.* 409: 185-200.

10 Otras moléculas distintas a los péptidos se pueden usar como antígenos o fragmentos antigénicos en complejos con moléculas de MHC, y las moléculas de ese tipo incluyen, pero no se limitan a, carbohidratos, lípidos, moléculas pequeñas y similares. Los carbohidratos son componentes principales de la superficie externa de una diversidad de células. Ciertos carbohidratos son característicos de diferentes etapas de diferenciación y muy a menudo estos carbohidratos son reconocidos por anticuerpos específicos. La expresión de carbohidratos distintos se puede limitar a tipos celulares específicos.

D. Sustratos/Nanopartículas

20 En cierto aspecto, los complejos de antígeno/MHC se acoplan de forma operativa a un sustrato que se puede unir mediante enlace covalente o no covalente al sustrato. Un sustrato puede estar en forma de una nanopartícula que opcionalmente comprende un material biocompatible y/o bioabsorbible. Por consiguiente, en una realización, la nanopartícula es biocompatible y/o bioabsorbible. En otro aspecto, la nanopartícula tiene un núcleo sólido y/o no es un liposoma. Un sustrato también puede estar en forma de una nanopartícula como las que se han descrito anteriormente en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2009/0155292. Las nanopartículas pueden tener una estructura de dimensión variable y se conocen diversamente una nanoesfera, una nanopartícula o una nanoesfera biodegradable biocompatible o una nanopartícula biodegradable biocompatible. Las formulaciones en partículas de ese tipo que contienen un complejo de antígeno/MHC se pueden formar mediante acoplamiento covalente o no covalente del complejo a la nanopartícula.

30 Las nanopartículas consisten generalmente en un núcleo básicamente esférico y opcionalmente una o más capas. El tamaño y la composición del núcleo pueden variar. Además del núcleo, la nanopartícula puede tener una o más capas para proporcionar funcionalidades apropiadas para las aplicaciones de interés. Los grosores de las capas, si estuvieran presentes, pueden variar según las necesidades de las aplicaciones específicas. Por ejemplo, las capas pueden impartir propiedades ópticas útiles.

35 Las capas también pueden impartir funcionalidades químicas o biológicas, a las que se hace referencia en el presente documento como capas químicamente activas o biológicamente activas, y para estas funcionalidades, la capa o capas generalmente pueden tener un grosor de aproximadamente 0,001 micrómetros (1 nanómetro) a aproximadamente 10 micrómetros o más (dependiendo del diámetro deseado de la nanopartícula), estas capas siendo aplicadas generalmente en la superficie exterior de la nanopartícula.

40 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, poli(acrilamida), poli(acrilonitrilo), poliamida, fluoropolímeros, silicona, celulosa, 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 composición homogénea, o un compuesto de dos o más clases de material, dependiendo de las propiedades deseadas. En ciertos aspectos, se usarán 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 la Patente de Estados Unidos N.º 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.

50 El núcleo podría ser de composición homogénea, o una combinación de dos o más clases de material dependiendo de las propiedades deseadas. En ciertos aspectos, se usarán nanoesferas metálicas. Estas nanopartículas metálicas se pueden formar a partir de Fe, Ca, Ga y similares. En ciertas realizaciones, la nanopartícula comprende un núcleo que comprende metal u óxido metálico tal como oro u óxido de hierro.

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

Las capas se pueden producir sobre las nanopartículas en una diversidad de formas conocidas por los expertos en la materia. Los ejemplos incluyen técnicas de química de sol-gel como las que se describen en Iler, *Chemistry of Silica*, John Wiley & Sons, 1979; Brinker y Scherer, *Sol-gel Science*, Academic Press, (1990). Los enfoques adicionales para producir capas sobre nanopartículas incluyen química de superficie y técnicas de encapsulación, como se describe 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 los mismos. También se pueden usar técnicas de deposición de vapor; véase por ejemplo Golman y Shinohara, *Trends Chem. Engin.*, 6: 1-6, (2000); y Pat. de Estados Unidos N.º 6.387.498. Además otros enfoques adicionales incluyen técnicas de autoensamblaje de capa a capa como las que 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); de Estados Unidos N.º 6.103.379 y referencias mencionadas en los mismos.

Las nanopartículas se pueden formar al poner en contacto una fase acuosa que contiene el complejo de antígeno/MHC/molécula coestimuladora y un polímero y una fase no acuosa seguido por la evaporación de la fase no acuosa para producir la coalescencia de partículas de la fase acuosa como se muestra en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 4.589.330 o 4.818.542. Los polímeros preferentes para las preparaciones de ese tipo son copolímeros naturales o sintéticos o polímeros seleccionados entre el grupo que consiste en agar de gelatina, almidón, arabinogalactano, albúmina, colágeno, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, glicólido-L(-)lactida poli(épsilon-caprolactona), poli(épsilon-caprolactona-CO-ácido láctico), poli(épsilon-caprolactona-CO-ácido glicólico), poli(ácido β -hidroxi butírico), poli(óxido de etileno), polietileno, poli(2-cianoacrilato de alquilo), poli(metacrilato de hidroxietilo), poliamidas, poli(aminoácidos), poli(2-hidroxietil DL-aspartamida), poli(éster urea), poli(L-fenilalanina/etilenglicol/1,6-diisocianatoheptano) y poli(metacrilato de metilo). Los polímeros particularmente preferentes son poliésteres, tales como ácido poliglicólico, ácido poliláctico, glicólido-L(-)lactida poli(épsilon-caprolactona), poli(épsilon-caprolactona-CO-ácido láctico) y poli(épsilon-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 μ m. En ciertas realizaciones, la nanopartícula tiene un diámetro inferior a aproximadamente 1 μ m. En otras realizaciones, la nanopartícula tiene un diámetro inferior a aproximadamente 500 nm, inferior a aproximadamente 400 nm, inferior a aproximadamente 300 nm, inferior a aproximadamente 200 nm, inferior a aproximadamente 100 nm, o inferior a aproximadamente 50 nm. 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 tiene un diámetro 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 μ m. En ciertas realizaciones, el complejo tiene un diámetro inferior a aproximadamente 1 μ m o alternativamente inferior a 100 nm. En otras realizaciones, el complejo tiene un diámetro inferior a aproximadamente 500 nm, inferior a aproximadamente 400 nm, inferior a aproximadamente 300 nm, inferior a aproximadamente 200 nm, inferior a aproximadamente 100 nm, o inferior a aproximadamente 50 nm. En realizaciones adicionales, el complejo tiene un diámetro 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.

E. Acoplamiento del Complejo de Antígeno-MHC a la Nanopartícula

Para acoplar el sustrato o las nanoesferas a los complejos antígeno-MHC, se pueden aplicar las siguientes técnicas.

La unión se puede generar modificando químicamente el sustrato o nanopartícula, lo que generalmente implica la generación de "grupos funcionales" en la superficie, dichos grupos funcionales siendo capaces de unirse a un complejo de antígeno-MHC, y/o unirse la superficie opcionalmente modificada por vía química del sustrato o nanopartícula con las denominadas "moléculas de unión" mediante enlace covalente o no covalente, seguido por la reacción del complejo de antígeno-MHC con las nanopartículas obtenidas.

La expresión "molécula de unión" se refiere a una sustancia capaz de unirse al sustrato o 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 conector. Los ejemplos no limitantes de conectores adecuados incluyen conectores de dopamina (DPA)-polietilenglicol (PEG) tales como éster de DPA-PEG-NHS, disulfuro de DPA-PEG-ortopiridilo (OPSS) y/o DPA-PEG-Azida. Otros conectores incluyen conectores peptídicos, etilenglicol, biotina y estreptavidina.

La expresión "grupos funcionales", como se ha usado anteriormente en el presente documento, no se limita a grupos

químicos reactivos que forman enlaces covalentes, sino que también incluye grupos químicos que conducen a una interacción iónica o enlaces de hidrógeno con el complejo de antígeno-MHC. Además, se debería indicar que no es posible una distinción estricta entre "grupos funcionales" generados en la superficie y las moléculas de unión que portan "grupos funcionales", ya que en ocasiones la modificación de la superficie requiere la reacción de moléculas de unión más pequeñas tales como etilenglicol con la superficie de la nanoesfera.

Los grupos funcionales o las moléculas de unión que los portan se pueden seleccionar entre grupos amino, grupos ácido carbónico, tioles, tioéteres, disulfuros, guanidino, grupos hidroxilo, grupos amino, dioles vecinales, aldehídos, grupos alfa-haloacetilo, compuestos orgánicos de mercurio, grupos éster, haluro de ácido, tioéster de ácido, anhídrido de ácido, isocianatos, isotiocianatos, haluros de ácido sulfónico, imidoésteres, diazoacetatos, sales de diazonio, 1,2-dicetonas, ácidos fosfónicos, ésteres del ácido fosfórico, ácidos sulfónicos, azóidos, imidazoles, indoles, N-maleimidadas, compuestos carbonílicos alfa-beta-insaturados, halogenuros de arilo o sus derivados.

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

Un ejemplo específico de un conector covalente incluye poli(etilen)glicol (PEG), tal como los PEG funcionalizados. Como se usa en el presente documento, los "PEG funcionalizados" se refieren a restos de PEG que incluyen un grupo funcional terminal, cuyos ejemplos no limitantes incluyen amino, mercapto, tioéter, carboxilo y similares. Los ejemplos no limitantes de conectores de PEG funcionalizados en diversos núcleos de nanopartícula se proporcionan en las Tablas 1 y 2 unidas al presente documento, por ejemplo, el conector de PEG tiol-PEG-NH₂.

En ciertas realizaciones, el conector como se describe en el presente documento tiene un tamaño definido. En algunas realizaciones, el conector es menor que aproximadamente 10 kD, menor que aproximadamente 5 kD, menor que aproximadamente 4,5 kD, menor que aproximadamente 4 kD, menor que aproximadamente 3,5 kD, menor que aproximadamente 3 kD, menor que aproximadamente 2,5 kD, menor de aproximadamente 2 kD, o menor que aproximadamente 1 kD. En realizaciones adicionales, el conector es de aproximadamente 0,5 kD a aproximadamente 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5 o 1 kD. En otras realizaciones adicionales, el conector es de aproximadamente 1 a aproximadamente, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2 o 1,5 kD.

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

La superficie del sustrato o nanopartícula se puede modificar químicamente, por ejemplo, mediante la unión de derivados de ácido fosfónico que tienen grupos reactivos funcionales. Un ejemplo de estos derivados del ácido fosfónico o del éster del ácido fosfónico es el ácido imino-bis(metilfosfono) carbónico que se puede sintetizar de acuerdo con la reacción "Mannich-Moedritzer". Esta reacción de unión se puede realizar con sustrato o nanoesfera tal como se obtiene directamente del proceso de preparación o después de un tratamiento previo (por ejemplo, con bromuro de trimetilsililo). En el primer caso, el derivado de ácido fosfónico (éster) puede, por ejemplo, desplazar los componentes del medio de reacción que todavía están unidos a la superficie. Este desplazamiento se puede mejorar a temperaturas más elevadas. Por otra parte, se cree que el bromuro de trimetilsililo desalquila los agentes formadores de complejos a base de fósforo que contienen grupos alquilo, creando de ese modo nuevos sitios de unión para el derivado del ácido fosfónico (éster). El derivado del ácido fosfónico (éster), o las moléculas de unión unidas al mismo, pueden mostrar los mismos grupos funcionales que se proporcionaron anteriormente. Un ejemplo adicional del tratamiento superficial del sustrato o nanoesfera implica el calentamiento en un diol tal como etilenglicol. Se debería indicar que este tratamiento puede ser redundante si la síntesis ya evolucionó a un diol. En estas circunstancias, es probable que el producto de síntesis obtenido directamente muestre los grupos funcionales necesarios. Sin embargo, este tratamiento se puede aplicar al sustrato o nanopartícula que se produjeron en agentes formadores de complejos que contienen 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 complejos) que aún se une a la superficie se pueden reemplazar por el diol y/o se pueden desalquilar.

También es posible reemplazar los agentes formadores de complejos que contienen N todavía unidos a la superficie de la partícula por derivados de amina primaria que tienen un segundo grupo funcional. La superficie del sustrato o nanopartícula también se puede revestir con sílice. La sílice permite una conjugación química relativamente sencilla de moléculas orgánicas, ya que la sílice reacciona fácilmente con conectores orgánicos, tales como trietoxisilano o clorosilano. La superficie de la nanopartícula también se puede revestir con homo- o copolímeros. Los ejemplos de agentes de acoplamiento polimerizables son N-(3-aminopropil)-3-mercaptopbenzamida, 3-(trimetoxisilil)propilhidrazida y 3-(trimetoxisilil)propilmaleimida. En el presente documento se mencionan otros ejemplos no limitantes de agentes de acoplamiento polimerizables. Estos agentes de acoplamiento se pueden usar individualmente o en combinación, dependiendo del tipo de copolímero que se va a generar como revestimiento.

Otra técnica de modificación de superficie que se puede usar con compuestos de metales de transición oxídicos que contienen sustratos o nanopartículas es la conversión de los compuestos de metales de transición oxídicos por gas cloro o agentes de cloración orgánicos en los correspondientes oxiclорuros. Estos oxiclорuros son capaces de reaccionar con nucleófilos, tales como grupos hidroxilo o amino, tal como se encuentran a menudo en biomoléculas. Esta técnica permite generar una conjugación directa con proteínas, por ejemplo, a través del grupo amino de las cadenas laterales de lisina. La conjugación con proteínas después de la modificación de la superficie con oxiclорuros también se puede realizar usando un conector difuncional, tal como hidrazida del ácido maleimidopropiónico.

Para las técnicas de enlace no covalentes, son particularmente adecuadas las moléculas de tipo cadena que tienen una polaridad o carga opuesta a la superficie del sustrato o nanoesfera. Los ejemplos para unir moléculas que pueden estar unidas de forma no covalente a las nanoesferas de núcleo/envoltura implican tensoactivos iónicos, catiónicos o aniónicos, proteínas ácidas o básicas, poliaminas, poliamidas, polisulfona o ácido policarboxílico. La interacción hidrófoba entre sustrato o nanoesfera y el reactivo anfífilo que tiene un grupo reactivo funcional puede generar el enlace necesario. En particular, son útiles las moléculas de tipo cadena con carácter anfífilo, tales como fosfolípidos o polisacáridos derivatizados, que se pueden reticular entre sí. La absorción de estas moléculas en la superficie se puede conseguir mediante coincubación. La unión entre la molécula de afinidad y el sustrato o nanopartícula también se puede basar en enlaces auto-organizantes, no covalentes. Un ejemplo de lo mismo implica sondas de detección simple con biotina como molécula de unión y moléculas acopladas a avidina o estreptavidina.

Los protocolos para el acoplamiento de reacciones de grupos funcionales a moléculas biológicas se pueden encontrar en la bibliografía, por ejemplo, en "Bioconjugate Techniques" (Greg T. Hermanson, Academic Press 1996). La molécula biológica (por ejemplo, la molécula de MHC o derivado de la misma) se puede acoplar a la molécula de unión, mediante enlace covalente o no covalente, en línea con procedimientos convencionales de química orgánica tales como oxidación, halogenación, alquilación, acilación, adición, sustitución o amidación. Estos métodos para acoplar la molécula de unión unida mediante enlace covalente o no covalente se pueden aplicar antes del acoplamiento de la molécula de unión al sustrato o nanoesfera o posteriormente. Además, es posible, por medio de la incubación, realizar una unión directa de moléculas a un sustrato o nanopartícula tratada previamente (por ejemplo, con bromuro de trimetilsililo), que presenta una superficie modificada debido a este tratamiento previo (por ejemplo, una carga más elevada o superficie polar).

F. Producción de Proteínas

La presente divulgación describe polipéptidos, péptidos y proteínas para uso en diversas realizaciones de la presente divulgación. Por ejemplo, se someten a ensayo péptidos específicos y sus complejos para determinar su capacidad para provocar o modular una respuesta inmune. En realizaciones específicas, todos o parte de los péptidos o proteínas también se pueden sintetizar en solución o en un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Diversos agentes sintetizadores automáticos están disponibles en el mercado y se pueden usar de acuerdo con protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, Stewart e 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 (Eds.), Academic Press, NY, 1-284, (1979). Alternativamente, se puede usar tecnología de ADN recombinante en la que una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido se inserta en un vector de expresión, se transforma o se transfecta en una célula hospedadora apropiada y se cultiva en condiciones adecuadas para expresión.

Una realización incluye el uso de la transferencia genética a células, incluyendo microorganismos, para la producción de proteínas. El gen para la proteína de interés se puede transferir en células hospedadoras apropiadas, seguido del cultivo de células en las condiciones apropiadas. Se puede usar un ácido nucleico que codifica prácticamente cualquier polipéptido. La generación de vectores de expresión recombinante, y los elementos incluidos en los mismos, son conocidos por los expertos en la materia y se discuten brevemente en el presente documento. Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamíferos 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 líneas celulares de células de ovario de hámster chino (CHO), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN y MDCK. Además, se puede elegir una cepa de célula hospedadora que modula la expresión de las secuencias insertadas, o que modifica y procesa el producto genético de la manera deseada. Las modificaciones de ese tipo (por ejemplo, glicosilación) y el procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos de proteínas pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación de proteínas posteriores a la traducción. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para garantizar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña expresada.

Se puede usar un número de sistemas de selección que incluyen, pero no se limitan a, genes de timidina quinasa del VHS, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y adenina fosforribosiltransferasa, en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, la resistencia a antimetabolitos se puede usar como la base de la selección: para dhfr, que confiere resistencia a trimetoprim y metotrexato; gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico; neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G418; e hgro, que confiere resistencia a higromicina.

G. Ácidos Nucleicos

La presente divulgación incluye polinucleótidos recombinantes que codifican las proteínas, polipéptidos, péptidos que se desvelan en el presente documento, tales como los que codifican péptidos antigénicos.

5 En realizaciones particulares, en el presente documento se desvelan segmentos de ácido nucleico aislados y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ácidos nucleicos que codifican un autoantígeno y/o una molécula de MHC. El término "recombinante" se puede usar en conjunto con un polipéptido o el nombre de un polipéptido específico, y esto generalmente se refiere a un polipéptido producido a partir de una molécula de ácido nucleico que se ha manipulado *in vitro* o que es un producto de replicación de una molécula de ese tipo.

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

V. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y ADMINISTRACIÓN

25 En el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de enfermedades.

A. Composiciones Farmacéuticas

30 Los complejos de antígeno-MHC nanopartículas se pueden administrar solos o en combinación con un vehículo, tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable en una composición. Las composiciones se pueden administrar de manera convencional por vía parenteral, mediante inyección, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía subcutánea o por vía intramuscular. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales. Las formulaciones orales incluyen los excipientes de ese tipo usados normalmente tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 95 % de principio activo, preferentemente de aproximadamente un 25 % a aproximadamente un 70 %. La preparación de una composición acuosa que contiene un complejo de antígeno-MHC-nanopartícula que modifica la condición inmune del sujeto será conocida por las personas con experiencia en la materia a la vista de la presente divulgación. En ciertas realizaciones, una composición se puede inhalar (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 6.651.655). En una realización, el complejo de antígeno-MHC-nanopartícula se administra por vía sistémica.

45 Generalmente, las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz y modificado la del sistema inmunológico. La cantidad a administrar depende del sujeto que se va a tratar. Las cantidades precisas de principio activo requeridas para su administración dependen del criterio del profesional. Sin embargo, los 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 la administración inicial y los refuerzos también son variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida por administraciones posteriores.

50 En muchos casos, será deseable tener múltiples administraciones de un complejo de péptido-MHC-nanopartícula, aproximadamente, como máximo o al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más. Las administraciones normalmente variarán desde intervalos de 2 días a doce semanas, más habitualmente de intervalos de una a dos semanas. Los refuerzos periódicos a intervalos de 0,25-5 años, habitualmente dos años, pueden ser deseables para mantener la condición del sistema inmunológico. El curso de las administraciones puede ir seguido de ensayos para respuestas inmunes inflamatorias y/o actividad de linfocitos T autorreguladores.

60 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto. Diferentes realizaciones implican la administración de una cantidad eficaz de una composición de complejo de antígeno-MHC-nanopartícula a un sujeto. Además, las composiciones de ese tipo se pueden administrar en combinación con modificadores del sistema inmunológico. Las composiciones de ese tipo generalmente se disolverán o dispersarán en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

65 Las expresiones "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades

moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción no deseada cuando se administran a un animal o ser humano. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de absorción, y similares. El uso de los medios y agentes de ese tipo para sustancias activas farmacéuticas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en la que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los principios activos, se contempla su uso en composiciones inmunogénicas y terapéuticas.

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 se debe conservar frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Las composiciones se pueden formular en forma neutra o salina. 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 ácido 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 férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

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

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 un modo tal que no disminuya las propiedades terapéuticas del complejo de antígeno-MHC-nanopartícula. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos entre los que se han enumerado anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferentes son técnicas de secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del principio activo, más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución del mismo esterilizada previamente. Uno de estos métodos de esterilización de la solución es la filtración en entorno estéril; sin embargo, la presente divulgación pretende incluir cualquier método de esterilización que no disminuya de forma significativa las propiedades terapéuticas de los complejos de antígeno-MHC-nanopartícula. Los métodos de esterilización que implican calor y presión intensos, tales como tratamiento en autoclave, pueden comprometer la estructura terciaria del complejo, disminuyendo de ese modo significativamente las propiedades terapéuticas de los complejos de antígeno-MHC-nanopartícula.

Una cantidad eficaz de composición terapéutica se determina en función del objetivo deseado. La expresión "dosis unitaria" o "dosificación" se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas para su uso en un sujeto, cada unidad conteniendo una cantidad determinada previamente de la composición calculada para producir las respuestas deseadas que se han discutido anteriormente en asociación con su administración, es decir, la vía y régimen apropiados. La cantidad que se va administrar, de acuerdo tanto con el número de tratamientos como con la dosis unitaria, depende del resultado y/o la protección deseada. Las cantidades precisas de la composición también dependen del criterio del profesional 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 del tratamiento previsto (alivio de los síntomas con respecto a la cura) y la potencia, estabilidad y toxicidad de la composición particular. Después de la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéutica o profilácticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas de dosificación, tal como el tipo de soluciones inyectables que se han descrito anteriormente.

B. Terapia de Combinación

Las composiciones y métodos relacionados que se desvelan en el presente documento, en particular la administración de un complejo de antígeno-MHC-nanopartícula, también se pueden usar en combinación con la administración de terapias tradicionales. Estos incluyen, entre otros, 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, Baclofeno, estimulación cerebral profunda, Ampyra (dalfampridina), acupuntura y terapia física.

5 Cuando se usa terapia de combinación, se pueden usar diversas combinaciones, por ejemplo, la administración del 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.

10 La administración de las composiciones de complejo de péptido-MHC a un paciente/sujeto seguirá los protocolos generales para la administración de los compuestos de este tipo, teniendo en cuenta la toxicidad, si la hubiera. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. También se contempla que diversas terapias convencionales, tales como hidratación, se pueden aplicar en combinación con la terapia que se describe.

15 C. Administración *In Vitro* o *Ex Vivo*

Como se usa en el presente documento, el término administración *in vitro* se refiere a manipulaciones realizadas en células extraídas de o fuera de un sujeto, que incluyen, pero no se limitan a, células en cultivo. El término administración *ex vivo* se refiere a células que se han manipulado *in vitro*, y que posteriormente se administran a un sujeto. El término administración *in vivo* incluye todas las manipulaciones realizadas dentro de un sujeto, incluyendo las administraciones.

25 En ciertos aspectos, las composiciones se pueden administrar *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*. En determinadas realizaciones *in vitro*, los linfocitos T autólogos se incuban con composiciones que se desvelan en el presente documento. A continuación las células o tejido se pueden usar para análisis *in vitro*, o alternativamente para administración *ex vivo*.

30 VI. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan con la finalidad de ilustrar diversas realizaciones que se desvelan en el presente documento y no pretenden ser limitantes de ninguna manera. Los presentes ejemplos, junto con los métodos que se describen en el presente documento son actualmente representativos de realizaciones y son a modo de ejemplo, y no pretenden ser limitaciones.

35 Ejemplo 1. Preparación y análisis de nanopartículas de pMHC.

Producción de pMHC

40 Se usaron dos métodos diferentes para expresar complejos de pMHC de clase I. El primero implicó el repliegamiento de cadenas pesadas y ligeras de MHC de clase I expresadas en bacterias en presencia de péptido, seguido de purificación a través de filtración en gel y cromatografía de intercambio aniónico, tal como se describe (Garboczi, D.N. *et al.*, (1992) Proc Natl. Acad Sci USA 89: 3429-3433; Altman, J.D. *et al.*, (1996) Science 274: 94-96). El segundo implicó la expresión de complejos de MHC de clase I con altos rendimientos en células CHO de estilo libre transducidas con lentivirus como construcciones de una sola cadena en las que la secuencia de codificación peptídica, las cadenas ligeras y pesadas de MHC de clase I están unidas secuencialmente con conectores GS flexibles (Yu, Y.Y. *et al.*, (2002) J Immunol 168: 3145-3149) seguido de un conector carboxiterminal que codifica un sitio BirA, una marca de 6xHis que termina con una Cys libre. Las proteínas secretadas se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo usando columnas de níquel y cromatografía de intercambio aniónico y se usaron directamente para el revestimiento de NP o se biotinilaron para producir tetrámeros de pMHC pensando estreptavidina conjugada con fluorocromo. Los tetrámeros generados usando complejos de pMHC de una sola cadena representativos que codifican el péptido autoantigénico IGRP₂₀₆₋₂₁₄ por su mimético NRP-V7 se unen eficazmente a los linfocitos T CD8⁺ autorreactivos monoclonales afines pero no a sus homólogos policlonales (no se muestran), tal como se determina mediante citometría de flujo .

55 Los monómeros de pMHC de clase II recombinantes se purificaron inicialmente a partir de células SC2 de *Drosophila* transfectadas con construcciones que codifican cadenas I- β e I- α que llevan cremalleras de leucina c-Jun o c-Fos, respectivamente, y marcas de BirA y 6xHis como se ha descrito anteriormente (Stratmann, T. *et al.*, (2000) J Immunol 165: 3214-3225, Stratmann, T. *et al.*, (2003) J. Clin. Invest. 112: 3214-3225). Como los rendimientos de este enfoque fueron generalmente bajos y requirieron mucho tiempo, el Solicitante desarrolló un sistema de expresión en células CHO de estilo libre transducidas con lentivirus que codifican un mensaje monocistrónico en el que las cadenas peptídicas I β e I α del complejo están separadas por la secuencia de P2A que se salta el ribosoma (Holst, J. *et al.*, (2006) Nat Protoc 1: 406-417). Al igual que con las construcciones de pMHC de clase I de una sola cadena que se han descrito anteriormente, se añadió un conector que codifica un sitio BirA, una marca 6xHis y una Cys libre al extremo carboxiterminal de la construcción. Los complejos de pMHC de clase II autoensamblados se purificaron a partir de los sobrenadantes del cultivo celular mediante cromatografía de níquel seguido o intercambio aniónico y se usaron para revestir sobre los NP o se procesaron para biotinylación y formación de tetrámero como se ha descrito anteriormente. Los tetrámeros de pMHC de clase II generados usando

un complejo representativo de pMHC de clase II que codifica el péptido autoantigénico de 2.5mi están unidos de forma específica y eficaz por linfocitos T CD4⁺ autorreactivos monoclonales afines, tal como se determina mediante citometría de flujo.

5 Tinción de tetrámero de pMHC

Se prepararon los tetrámeros TUM-H-2K^d, NRP-V7-H-2K^d, IGRP₂₀₆₋₂₁₄-H-2K^d, HEL₁₄₋₂₂/IA⁹⁷ y BDC2.5mi/IA⁹⁷ conjugados con PE usando monómeros de pMHC biotinilados tal como se describe (Stratmann, T. *et al.*, (2000) J Immunol 165: 3214-3225; Stratmann, T. *et al.*, (2003) J. Clin. Invest. 112: 3214-3225; Amrani, A. *et al.*, (2000) Nature 406: 739-742). Las células mononucleares de sangre periférica, esplenocitos y linfocitos T CD8⁺ o CD4⁺ de los ganglios linfáticos se tiñeron con tetrámero (5 ug/ml) en tampón FACS (azida sódica al 0,1 % y FBS al 1 % en PBS) durante 1 h a 4 °C, se lavaron, y se incubaron con anti-CD8α o anti-CD4 conjugado con FITC (5 μg/ml) y anti-B220 conjugado con PerCP (2 μg/ml; como una puerta 'muda') durante 30 min a 4 °C. Las células se lavaron, se fijaron en PFA/PBS al 1 % y se analizaron mediante FACS.

15 Síntesis de NP

Las nanopartículas de oro (GNP) se sintetizaron usando reducción química de cloruro de oro con citrato sódico tal como se describe (Perrault, S.D. *et al.*, (2009) Nano Lett 9: 1909-1915). En resumen, se añadieron 2 ml de un 1 % de HAuCl₄, (Sigma Aldrich) a 100 ml de H₂O bajo agitación vigorosa y la solución se calentó en un baño de aceite. Se añadieron seis (para 14 nm de las GNP) o dos ml (para 40 nm de las GNP) de Citrato de Na al 1 % a la solución de HAuCl₄ en ebullición, que se agitó durante 10 minutos adicionales y a continuación se enfrió a temperatura ambiente. Las GNP se estabilizaron mediante la adición de 1 uMol de conectores de tiol-PEG (Nanocs, MA) funcionalizados con grupos -COOH o -NH₂ como aceptores de pMHC (**Tablas 1 y 2**). Las GNP pegiladas se lavaron con agua para eliminar el tiol-PEG libre, se concentraron y se almacenaron en agua para un análisis adicional. La densidad de NP se realizó mediante espectrofotometría y se calculó de acuerdo con la ley de Beer.

Las NP de óxido de hierro de la serie SFP (SFP IONPs) se produjeron mediante descomposición térmica de acetato de hierro en disolventes orgánicos en presencia de tensioactivos, a continuación se dejaron en disolvente en tampones acuosos mediante pegilación (Xie, J. *et al.*, (2007) Adv Mater 19: 3163; Xie, J. *et al.*, (2006) Pure Appl. Chem. 78: 1003-1014; Xu, C. *et al.*, (2007) Polymer International 56: 821-826). En resumen, 2 mMol de Fe(acac)₃ (Sigma Aldrich, Oakville, ON) se disolvieron en una mezcla de 10 ml de éter bencilico y oleilamina y se calentó a 100 °C durante 1 h seguido por calentamiento a 300 °C durante 2 h con reflujo bajo la protección de una manta de nitrógeno. Las NP sintetizadas se hicieron precipitar mediante la adición de etanol y se volvieron a suspender en hexano. Para la pegilación de las IONP, se disolvieron 100 mg de diferentes conectores de DPA-PEG de 3,5 kDa (S1-S5 en la **Tabla 1**; Jenkem Tech USA) en una mezcla de CHCl₃ y HCON(CH₃)₂ (DMF). La solución de NP (20 mg de Fe) se añadió a continuación a la solución de DPA-PEG y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. Las NP de SFP pegiladas se precipitaron durante la noche mediante la adición de hexano y a continuación se volverán a suspender en agua. Las cantidades traza de los agregados se eliminaron mediante centrifugación a alta velocidad (20.000 xg, 30 min), y las NP de SFP monodispersas se almacenaron en agua para una caracterización adicional y la conjugación con pMHC. La concentración de hierro en los productos IONP se determinó mediante espectrofotometría a A410 en HCl 2 N. Basándose en la estructura molecular y el diámetro de las NP de SFP (Fe₃O₄; 861 nm de diámetro) (Xie, J. *et al.*, (2007) Adv Mater 19: 3163; Xie, J. *et al.*, (2006) Pure Appl. Chem. 78: 1003-1014), el Solicitante calcula que las soluciones de SFP que contienen 1 mg de hierro contienen 5 x 10¹⁴ NPs.

El solicitante desarrolló posteriormente un nuevo diseño de IONP que permitió la formación, también por descomposición térmica, pero en una sola etapa, de las IONP pegiladas en ausencia total de tensioactivos (las IONP de la serie PF). En este diseño novedoso, las moléculas de PEG se usaron tanto como reactivos reductores como tensioactivos. En una reacción habitual, 3 g de PEG (2 kDa) se fundieron lentamente en un matraz de ebullición de fondo redondo de 50 ml a 100 °C y a continuación se mezclaron con 7 ml de éter bencilico y Fe(acac)₃ 2 mMol. La reacción se agitó vigorosamente durante una hora y se calentó a 260 °C con reflujo durante un periodo adicional de dos horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se transfirió a un tubo de centrifugación y se mezcló con 30 ml de agua. Los materiales insolubles se eliminaron mediante centrifugación a 2.000 xg durante 30 min. Las moléculas de PEG libres se eliminaron mediante ultrafiltración a través de filtros Amicon-15 (MWCO 100 kDa, Millipore, Billerica, MA). El solicitante fue capaz de generar IONPs con la mayoría, aunque no todas las moléculas de PEG analizadas (**Tabla 1**, P1-P5). El tamaño de las IONP varió dependiendo de los grupos funcionales de los conectores de PEG usados en las reacciones de descomposición térmica (**Tablas 1 y 2**). Las NP se podrían unificar fácilmente usando columnas magnéticas (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) o un sistema de separación de células IMag (BD BioSciences, Mississauga, ON). Las IONP purificadas se almacenaron en agua o en diversos tampones (pH 5-10) a temperatura ambiente o a 4 °C sin ninguna agregación detectable. La densidad de NP se calculó como se ha descrito anteriormente para las NP de SFP.

65 Conjugación de las NP con pMHC

La conjugación de pMHC con las NP producidas con los conectores de PEG portadores de grupos -NH₂ o -COOH distales se consiguió mediante la formación de enlaces amida en presencia de clorhidrato de 1-etil-3-[3-

dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC). Las NP (GNP-C, SFP-C y PF-C, **Tabla 2**) con grupos -COOH se disolvieron primero en un tampón MES 20 mM, pH 5,5. Se añadieron sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida (sulfa-NHS, Thermo scientific, Waltham, MA, concentración final 10 mM) y EDC (Thermo scientific, Waltham, MA, concentración final 1 mM) a la solución de NP. Después de 20 min de agitación a temperatura ambiente, la solución de NP se añadió gota a gota a la solución que contenía monómeros de pMHC disueltos en tampón borato 20 mM (pH 8,2). La mezcla se agitó durante un periodo adicional de 4 h. Para conjugar los pMHC a NP funcionalizadas con NH₂ (GNP-N, SFP-N y PF-N, **Tabla 2**), primero se disolvieron complejos de pMHC en tampón MES 20 mM, pH 5,5, que contenía NaCl 100 mM. A continuación se añadieron Sulfa-NHS (10 mM) y EDC (5 mM) a la solución de pMHC. Las moléculas de pMHC activadas se añadieron a continuación a la solución de NP en tampón borato 20 mM (pH 8,2) y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente.

Para conjugar pMHC con NP funcionalizadas con maleimida (SFP-M y PF-M, **Tabla 2 y FIG. 1C**), las moléculas de pMHC se incubaron primero con Tributillfosfina (TBP, 1 mM) durante 4 horas a temperatura ambiente. Los pMHC diseñadas para codificar un resto de Cys carboxyterminal libre se mezclaron a continuación con las NP en tampón fosfato 40 mM, pH 6,0, que contenía EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Los pMHC se unieron mediante enlace covalente con NP mediante la formación de un enlace carbono-sulfuro entre los grupos maleimido y el resto de Cys.

La química de click se usó para conjugar pMHC o avidina a NP funcionalizadas con grupos azida (SFP-Z, **Tabla 2**). Para esta reacción, las moléculas de pMHC o avidina se incubaron primero con reactivo de dibenzociclooctilo (DBCO, Click Chemistry Tools, Scottsdale, AZ) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las moléculas de DBCO libres se eliminaron mediante diálisis durante la noche. Los conjugados de pMHC- o avidina-DBCO se incubaron a continuación con SFP-Z durante 2 h, dando como resultado la formación de enlaces triazol entre los pMHC o moléculas de avidina y las NP.

Los complejos de pMHC no conjugados en las diferentes reacciones de conjugación de pMHC-NP se eliminaron mediante una amplia diálisis frente a PBS, pH 7,4, a 4 °C a través de membranas de corte de peso molecular de 300 kDa (Spectrum labs). Alternativamente, las IONP conjugadas con pMHC se purificaron mediante separación magnética. Las NP conjugadas se concentraron por ultrafiltración a través de unidades Ultra-15 (100 kDa MWCO) de Amicon y se almacenaron en PBS.

Microscopía electrónica, dispersión de luz dinámica, DLS y difracción de haz electrónico de ángulo pequeño

El tamaño del núcleo y la dispersión de las NP no conjugadas y las conjugadas con pMHC se evaluaron por primera vez mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, Hitachi H7650). Para determinar el tamaño hidrodinámico, el potencial zeta y la monodispersión de los pMHC-NP se usó dispersión dinámica de luz (DLS) usando un instrumento ZetaSizer (Malvern, Reino Unido). La naturaleza química del núcleo de óxido de hierro de la serie PF de las NP se evaluó usando difracción de haz electrónico de ángulo pequeño (SEBD).

Espectroscopía de Infrarrojos por Transformación de Fourier

Las propiedades químicas de la superficie de los diseños de IONP de la serie PF se evaluaron usando espectroscopía de infrarrojos por transformación de Fourier (FTIR). Los espectros FTIR de PEG de control y PEG anclado sobre la superficie de PF-NP se obtuvieron usando un espectrofotómetro Nicolet FTIR en un modo ATR (reflexión total atenuada). Cada uno de los espectros se registró como el promedio de 256 barridos a una resolución espectral de 4 cm⁻¹. Se identificaron las firmas de vibración de estiramiento de los grupos C-O-C de la cadena principal de PEG y sus grupos funcionales aceptores de pMHC distales.

Electroforesis en gel de agarosa

Para evaluar rápidamente los cambios en la carga de NP en función de la pegilación o el revestimiento de pMHC, las NP se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0,8 %. Las NP pegiladas migraron a polos negativos o positivos dependiendo de la carga total de la superficie. La tinción con azul de Coomassie se realizó para confirmar la migración conjunta de los pMHC con las NP.

Electroforesis en gel de poliacrilamida nativa y desnaturalizante

Las NP conjugadas con pMHC se sometieron a análisis de PAGE nativo (10 %) y SDS-PAGE (12 %) para confirmar la ausencia de pMHC libre (pMHC sin conjugar) en las preparaciones de pMHC-NP y para confirmar la presencia de complejos de pMHC trimoleculares intactos en la superficie de la NP.

Mediciones de valencia de pMHC

Para evaluar el número de monómeros de pMHC conjugados en las NP individuales (valencia de pMHC), los investigadores midieron la concentración de pMHC de las preparaciones de pMHC-NP usando diferentes enfoques, incluyendo el ensayo de Bradford (Thermo Scientific), análisis de aminoácidos (cuantificación basada en HPLC de

17 aminoácidos diferentes en preparaciones de pMHC-NP hidrolizadas (Universidad de Toronto), análisis de transferencia puntual-ELISA y análisis de péptidos de firma mediante espectrometría de masas) y los valores convertidos en proporciones de número molecular de pMHC con respecto a número de NP. En resumen, en el enfoque de "transferencia puntual-ELISA", las NP conjugadas con pMHC en conjugar y soluciones de monómero de pMHC (como patrones), los investigadores diluyeron las soluciones en serie en PBS y a continuación se absorbieron en una membrana de PVDF en una placa de filtro de múltiples pocillos (PALL Corporation). Se permitió que la placa se secase parcialmente a temperatura ambiente y a continuación se incubó con anticuerpos primarios específicos de pMHC (es decir, anticuerpos anti-β2M y anti-K^d para las NP revestidas con pMHC de clase I, clones 2M2 y SF1-1.1, BioLegend, San Diego, CA), seguido por anticuerpos secundarios conjugados con HRP o AP. Después del desarrollo de las reacciones de color enzimáticas, los contenidos de los pocillos se transfirieron a los pocillos en una placa de ELISA convencional y sus absorbancias se midieron a 450 nm usando un lector de placas. Para el enfoque de espectrometría de masas de péptido de firma, los investigadores identificaron péptidos de tripsina específicos de pMHC (péptidos de firma TWTAADTAALITR para complejos de K^d y AQNSELASTANMLR para complejos de I-A^{g7}) mediante espectrometría de masas. Los péptidos sintéticos correspondientes se marcaron con isótopos estables (síntesis de péptidos AQUA, Sigma Aldrich). Los péptidos marcados con isótopos se diluyeron en serie hasta concentraciones definidas y se mezclaron con las NP conjugadas con pMHC para digestión con tripsina. Las mezclas se sometieron a espectroscopía de masas (Agilent QTOF6520) para cuantificar las relaciones de péptidos de firma marcados con isótopos con respecto a los no marcados, como una lectura de la concentración de pMHC. Dado que los valores generados por estos diferentes métodos fueron similares, el ensayo de Bradford (que usa las NP no conjugadas como blancos) se convirtió en el método de elección por su facilidad y simplicidad.

Actividad agonista de pMHC-NPs *in vitro*

Los linfocitos CD8⁺ esplénicos clasificados con FACS de ratones TCR-TG (2,5 x 10⁵ células/ml) se incubaron con las NP conjugadas con pMHC o de control diluidas en serie durante 24-48 h a 37 °C. Los sobrenadantes se analizaron para IFNγ mediante ELISA. Las células cultivadas se pulsaron con 1 mCi de [³H]-timidina y se recogieron después de 24 h para medir la incorporación de [³H].

Terapia con pMHC-NP

Las poblaciones base de ratones NOD hembra de 10 semanas de edad se inyectaron i.v. con las NP revestidas con pMHC en PBS dos veces por semana durante 5 semanas (10 dosis en total). Los aumentos en el tamaño de las combinaciones de linfocitos T CD8⁺ o CD4⁺ de tetrámero+ en sangre, bazo, ganglios linfáticos y/o médula ósea, así como sus propiedades fenotípicas, se evaluaron mediante citometría de flujo tal como se describe (Tsai, S. *et al.*, (2010) *Immunity* 32: 568-580) (y Clemente-Casares *et al.*, presentado). En otros experimentos, los ratones que presentaban niveles de glucosa en sangre > 11 mM durante 2 días se trataron i.v. dos veces a la semana con pMHC-NP y se controló la hiperglucemia hasta una normoglucemia estable (durante 4 semanas). Los animales también se evaluaron diariamente para glucosuria y se les administró insulina humana isofánica (1 IU por día) s.c. si 3+.

Análisis estadístico

Los datos se compararon mediante los ensayos de t de Student bilateral, U de Mann-Whitney, Chi-cuadrado o ANOVA bilateral. La significación estadística se supuso a P < 0,05.

Ratones

Los ratones NOD/Lt eran de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME). Se han descrito ratones 17.4a/8.3 (8.3-NOD), 17.6a/8.3a (17.6-NOD) y BDC2-5-NOD (Katz, J.D. *et al.*, (1993) *Cell* 74: 1089-1100; Verdager, J. *et al.*, (1997) *J Exp Med* 186: 1663-1676; Han, B. *et al.*, (2005) *J Clin Invest* 115: 1879-1887).

Ejemplo 2. Producción de pMHC de clase II relevante para T1D

Varios complejos de péptido/I-Ag⁷ relevantes e irrelevantes para T1D (es decir, control negativo) se produjeron en células eucarióticas (células S2 o CHO). Los estudios con tetrámeros generados a partir de estas preparaciones de monómeros confirman que estos monómeros se secretan en el sobrenadante como complejos de pMHC correctamente plegados. La FIG. 2 proporciona un ejemplo.

Reversión de la hiperglucemia en ratones NOD por tratamiento con pMHC de clase II-NP relevantes para T1D

Los ratones NOD diabéticos se trataron dos veces a la semana con 7,5 µg de NPs revestidas con pMHC de clase II. Los ratones se consideraron curados cuando eran normoglucémicos durante 4 semanas, momento en el que se retiró el tratamiento. Como se muestra en la Fig. 3, mientras que 2.5mi/I-Ag⁷-, IGRP128-145/I-Ag⁷-, e IGRP₄₋₂₂/I-Ag⁷- NPs reversionaron la hiperglucemia en un 90-100 % de ratones (n = 29 ratones), el tratamiento con HEL₁₄₋₂₂/I-Ag⁷-NPs (un pMHC extraño) no tuvo efecto. Los ensayos de tolerancia a glucosa intraperitoneal (IPGTT) en ratones curados > 30 semanas después de la retirada del tratamiento proporcionó curvas que eran muy similares a las que se

producían en controles sin tratar no diabéticos emparejados por edades y significativamente diferentes a las obtenidas en ratones NOD con diabetes aguda sin tratar (FIG. 4). Por lo tanto, las NPs revestidas con pMHC de clase II relevante para T1D restauran la homeostasis de la glucosa en ratones diabéticos.

5 Los pMHC de clase II-NP relevantes para T1D expanden linfocitos T CD4⁺ autorreguladores de TR1 de memoria afines

Los estudios de sangre, bazos, ganglios linfáticos pancreáticos (PLN), ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y médula ósea de ratones diabéticos de 50 semanas de edad que se habían vuelto normoglucémicos por tratamiento con 2.5mi/l-Ag⁷-NPs revelaron un aumento significativo de los porcentajes de 2.5mi/l-Ag⁷ de linfocitos CD4⁺ Tetraméricos⁺, en comparación con los ratones estudiados al inicio de la diabetes o animales no diabéticos no tratados emparejados por edades (FIG. 5). La expansión de linfocitos T CD4⁺ era específica de antígeno (FIG. 5). El tiempo, la magnitud y la distribución de la expansión fueron similares para las tres NP de pMHC de clase II relevantes para T1D sometidas a ensayo (FIG. 6). Los análisis fenotípicos de las células tetraméricas⁺ expandidas con NP con respecto a las células tetraméricas⁻ en todas estas poblaciones base revelaron un fenotipo TR1 de tipo memoria (FIG. 7, parte superior) con co-expresión de los marcadores específicos de TR1 que se han descrito recientemente (Gagliani, N. *et al.*, (2013) Nature Medicine 19: 739-746) (FIG. 7, parte inferior): CD62^{bajo}/CD44^{alto}/ICOS⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ / TGFp⁺ de superficie/ CD49b⁺/LAG3⁺. El hecho de que estas células no fueran FoxP3⁺ se confirmó en ratones NOD que expresaban eGFP de promotor FoxP3, en el que todas las células expandidas con pMHC-NP eran negativas para eGFP (no se muestra).

De manera coherente con estos datos fenotípicos, los linfocitos CD4⁺ tetraméricos⁺ clasificados de los ratones tratados con pMHC-NP respondieron a las DC pulsadas con péptido afín secretando casi exclusivamente IL-10 y, en menor medida, IFN γ (FIG. 8 y no se muestra). Es importante destacar que los linfocitos T CD4⁺ purificados pero no los CD8⁺ de donantes tratados con pMHC-NP inhibieron la T1D en ratones NOD.scid a los que se les transfieren esplenocitos diabetogénicos y hospedadores tratados con las NPs de pMHC de clase II estaban protegidos al 100 % durante > 100 días (no se muestra).

Estas células tetraméricas⁺ expandidas con pMHC de clase II-NP, a diferencia de sus homólogos tetraméricos, inhibieron la proliferación de linfocitos T no afines a DC pulsadas con péptidos (presentando los péptidos dirigidos por las células de TR1 respondedoras y tetraméricas⁺). La adición de los mAb anti-IL-10 o anti-TGF β a los cultivos inhibió parcialmente la supresión, con respecto a los cultivos que recibieron anti-IFN γ o IgG de rata (no se muestra). Lo más importante es que los estudios de ratones diabéticos tratados con IGRP₄₋₂₂ o 2.5mi/l-A⁹⁷-NPs y bloqueando los mAb anti-IL-10, anti-TGF β o anti-IFN γ o IgG de rata (FIG. 9) indican que la restauración de la normoglucemia mediante las NP de pMHC de clase II requiere a IL-10 y TGF β pero no IFN γ . Sin embargo, los estudios en ratones NOD.*Il10*^{-/-} y NOD.*Ifng*^{-/-} espontáneamente diabéticos sugieren que la expresión tanto de IL-10 como de IFN γ es necesaria para el desarrollo de las células de TR1 que se expanden como respuesta a pMHC de clase II-NPs; en estos ratones, la terapia con pMHC-NP expandió las células similares a Th2 (NOD.*Ifng*^{-/-}) o las células IFN γ +/IL-4⁺/IL10⁻ (ratones NOD.*Il10*^{-/-}). Los estudios en ratones IGRP^{-/-} NOD diabéticos (incapaces de cebar los linfocitos T reactivos hacia IGRP) mostraron que estos ratones no respondían a IGRP₄₋₂₂/I-A⁹⁷-NPs (no se produjo una expansión de linfocitos T o restauración normoglucemia) porque estos ratones carecían de células cebadas con IGRP₄₋₂₂. Por el contrario, todos los ratones IGRP^{-/-}NOD diabéticos tratados con 2.5mi/l-A⁹⁷-NPs se curaron (no se muestra). Por lo tanto, los pMHC de clase II-NPs, similares a los pMHC de clase I-NPs, funcionan mediante la expansión de la memoria reguladora cebada por la enfermedad, pero no pueden cebar estas respuestas *de novo* porque carecen de señales co-estimuladoras.

Por último, los estudios con el virus Vaccinia (rVV) mostraron que los ratones NOD tratados con pMHC de clase II-NP pueden eliminar fácilmente una infección viral aguda (FIG. 10A). De acuerdo con esto, los ratones tratados pueden remontar respuestas de anticuerpos frente a un antígeno modelo en adyuvante (FIG. 10B).

50 Ejemplo 3. Los pMHC de clase II-NP mono-específicos disminuyen la gravedad de EAE.

A continuación el solicitante sometió a ensayo el potencial terapéutico de un nanomedicamento basada en pMHC de clase II en Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE). Este modelo se usó en el ensayo más riguroso posible: investigar si los pMHC-NP pueden revertir la EAE establecida en lugar de prevenir o limitar su desarrollo. Este no es un problema trivial. Una revisión reciente de las intervenciones en EAE muestra que < 1 % de más de 400 estudios iniciaron el tratamiento 21 días después de la inducción de EAE (Holst, J. *et al.*, (2006) Nat Protoc 1: 406-417); los datos informados se obtuvieron en ratones en los que el tratamiento se inició 21 días después de la inducción de EAE y mejoró las puntuaciones de la enfermedad de una manera dependiente de la dosis (FIG. 11).

60 Ejemplo 4. Síntesis y control de calidad de NP revestidas con pMHC de clase II

El solicitante desarrolló un diseño optimizado de NP de óxido de hierro que no usa tensioactivos para la síntesis y produce preparaciones altamente estables y monodispersas que se pueden cargar con cargas óptimas de pMHC. Aunque se pueden usar varias químicas de revestimiento de pMHC diferentes (FIG. 12A), el Solicitante usa regularmente las NP funcionalizadas con los PEG conjugados con maleimida, que aceptan altas valencias de los

pMHC diseñados para codificar una Cys libre en su extremo carboxiterminal (hasta más de 60 pMHC/NP). Estas NPs de pMHC de clase II se procesan a través de varias comprobaciones de control de calidad para definir las valencias de pMHC por NP (transferencia puntual-ELISA, análisis de aminoácidos), densidad de NP, carga de NP y tamaño de NP (núcleo metálico, tal como se define mediante TEM; y diámetro hidrodinámico, tal como se define mediante dispersión dinámica de luz (DLS)). La **FIG. 12B** muestra una imagen de TEM representativa y la **FIG. 12C** muestra perfiles de DLS detrás NP sin revestir con pMHC frente a las revestidas con pMHC. Un régimen de dosificación habitual implica la administración de 1-50 µg de pMHC total (revestida con NP) por dosis (aproximadamente 2 ul de la preparación diluido en 100 ul de PBS).

10 **Ejemplo 5. Tratamiento con las NP revestidas con pMHC de clase II**

Los datos anteriores son coherentes con los datos obtenidos previamente por el Solicitante en ratones tratados con las NP de pMHC de clase I: las NP de pMHC de clase II expanden los linfocitos T reguladores de memoria afines (en este caso, TR1) que suprimen la presentación de otros péptidos autoantigénicos por APC cargados con autoantígeno local (Amrani, A. *et al.*, (2000) Nature 406: 739-742).

Se ha informado que los clones de linfocitos T CD4⁺ TR1 humanos destruyen ciertos subconjuntos de APC profesionales, tales como las células dendríticas (DC) (Amrani, A. *et al.*, (2000) Nature 406: 739-742). Por lo tanto, el solicitante investigó si los linfocitos TR1 específicos de antígeno que se expanden como respuesta a la terapia superior de MHC de clase II-NP suprimían la autoinmunidad al eliminar las APC cargadas con autoantígenos. Esto se hizo transfundiendo mezclas a 1:1 de DC pulsadas con péptidos 2.5mi o GPI y marcadas con PKH26 (DC pulsadas con 2.5mi) o CFSE (DC pulsadas con GPI), en ratones NOD que habían recibido 10 dosis de 2.5mi/IA⁹⁷-NPs durante las 5 semanas anteriores, o ratones NOD que no habían recibido ningún tratamiento. Los hospedadores se sacrificaron 7 días después para comparar las proporciones de células PKH26+ con respecto a CFSE+ en los dos hospedadores diferentes. Como se muestra en la **FIG. 13A** (paneles en la parte superior), no se observaron diferencias, lo que sugiere que los linfocitos T CD4⁺ TR1 que se expanden como respuesta a la terapia con pMHC-NP no destruyen las DC que expresan antígeno.

Para investigar si esto era una peculiaridad del tipo de APC usado (una DC) o una característica general de otros tipos de APC, se repitieron los experimentos anteriores, pero se usando linfocitos B esplénicos a diferencia de las DC. Inesperadamente, se encontró que el número de linfocitos B pulsados con 2.5mi se expandieron (en lugar de disminuir) en los hospedadores que habían sido tratados con las NP revestidas con 2.5mi/IA⁹⁷-NPs (**FIG. 13A**, paneles de la parte inferior). Esto fue inesperado porque, basándose en el estado de la técnica, se esperaba el resultado opuesto (una disminución selectiva y específica de los linfocitos B pulsados con 2.5mi en comparación con sus homólogos pulsados con GPI).

A continuación el solicitante determinó si un efecto de ese tipo de expansión de linfocitos B del tratamiento con pMHC de clase II-NP se podía documentar comparando los números absolutos y los porcentajes de linfocitos B en los ganglios linfáticos que drenan en páncreas (PLN) y no drenantes (MLN) de ratones tratados con 2.5mi/IA⁹⁷-NPs con respecto a controles sin tratar. Como se muestra en la **FIG. 13B**, los ratones NOD tratados con pMHC de clase II-NP presentaban un aumento notable en el porcentaje de linfocitos B en el PLN pero no en la MLN. No se observaron tales diferencias en el PLN frente al MLN de ratones NOD no tratados, lo que indica que estos efectos fueron consecuencia de la terapia con pMHC-NP. En particular, hubo una correlación estadísticamente significativa entre la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ TR1 específicos de 2.5mi en los PLN de ratones individuales y la frecuencia de linfocitos B asociados a PLN, lo que sugiere que tal aumento de reclutamiento de linfocitos B en los PLN de los ratones NOD tratados con pMHC-NP fueron controlados por los linfocitos T CD4⁺ TR1 específicos de 2.5mi que se expandieron como respuesta a la terapia con MHC-NP.

Colectivamente, estos datos plantearon la posibilidad de que los linfocitos B que se expandieron como respuesta a la terapia con MHC-NP pudieran ser linfocitos B reguladores, es decir, linfocitos B que adquieren la capacidad de producir IL-10 como respuesta a interacciones afines con los linfocitos T CD4⁺ TR1 expandidos por pMHC-NP. Este escenario de caso plantea que los linfocitos T CD4⁺ TR1 específicos de 2.5mi podrían inducir la diferenciación y expansión de los linfocitos B específicos de cromogranina A indiferenciados (la cromogranina A es la fuente antigénica natural del epítipo de 2.5mi) que ha capturado la cromogranina A y, por lo tanto, presentan los correspondientes complejos de 2.5mi/IA⁹⁷ pMHC en su superficie, con respecto a células Breg productoras de IL-10.

Para someter a ensayo esta hipótesis, el Solicitante transfundió linfocitos B pulsados con 2.5mi o GPI (marcados con PKH26) de una cepa de ratones NOD en la que uno de sus dos loci de IL10 lleva una inserción dirigida de un casete de IRES-eGFP entre el codón de parada y la señal de poliadenilación del exón 5 (11), en los hospedadores de NOD tratados con 2.5mi/IA⁹⁷-NP o no tratados.

Siete días después de la transferencia, se determinó el fenotipo citométrico de flujo de los linfocitos B PKH26+ del donante en los hospedadores (**FIG. 13C**, panel superior). Como se muestra en la **FIG. 13C** (paneles central e inferior), una fracción significativa de los linfocitos B del donante expresaron eGFP codificado por IL10 y ambos eran CD5+ y CD1d^{allo}. Estos son tres marcadores clave de las células Breg (Xie, J. *et al.*, (2007) Adv Mater 19: 3163; Xie, J. *et al.*, (2006) Pure Appl. Chem. 78: 1003-1014). Esto solo se observó con los linfocitos B pulsados con 2.5mi, pero

no con los linfocitos B pulsados con un péptido de control negativo (GPI), y solo ocurrió en ratones tratados con pMHC-NP. Es importante destacar que este efecto fue mediado, al menos en parte, por los linfocitos T CD4⁺ TR1 expandidos con pMHC-NP de IL-10, porque una respuesta de ese tipo no se observó en los hospedadores NOD deficientes en IL-10.

5 Tomados en conjunto, estos datos demuestran que la terapia con pMHC de clase II-NP induce la diferenciación y expansión de linfocitos B específicos de antígeno en linfocitos B reguladores.

10 La descripción de los datos que sugieren la existencia de linfocitos B con propiedades reguladoras se puede encontrar en la bibliografía que se remonta a 1974. De manera similar a los linfocitos T CD4⁺ TR1 que se expanden como respuesta a la terapia con pMHC de clase II-NP, las células Breg expresan citoquinas inmunosupresoras, incluyendo IL-10 y TGFb, así como otras moléculas que pueden inhibir los linfocitos T y B autorreactivos patógenos de una manera altamente específica y dependiente de antígeno, a través de interacciones de célula a célula dirigidas por pMHC de clase II (Xu, C. *et al.*, (2007) *Polymer International* 56: 821-826). Aunque se ha demostrado que
15 diferentes estímulos pueden inducir la formación de Breg *in vitro*, y en mucho menor grado *in vivo*, según el mejor conocimiento del Solicitante, en la actualidad no existe un enfoque terapéutico capaz de inducir y expandir células Breg específicas de antígeno *in vivo*. Mediante la obtención de linfocitos T CD4⁺ TR1 altamente específicos de la enfermedad, el Solicitante demuestra que los nanomedicamentos basados en pMHC de clase II también provocan células Breg específicas de la enfermedad. Dado que las células Breg también pueden promover la diferenciación de efector en linfocitos T CD4⁺ TR1, los nanomedicamentos basados en pMHC de clase II desencadenan una respuesta inmunosupresora profunda y sostenida que es altamente específica de antígeno y por lo tanto es capaz de suprimir de forma selectiva las respuestas autoinmunes sin comprometer la inmunidad sistémica.

25 **Ejemplo 6. Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro de superficie funcionalizada por descomposición térmica de acetilacetato de hierro, y su bioconjugación**

El PEG se funde. Se añaden éter bencílico y acetilacetato de hierro. Después de 1 hora de calentamiento a 105 °C, la temperatura se aumenta a 260 °C y se calienta a reflujo. Después de aproximadamente 2 horas, se forman nanopartículas de hierro y el color de la solución se vuelve negro. La reacción se enfría a temperatura ambiente y se añade una cierta cantidad de agua para extraer las nanopartículas del recipiente de reacción. Las nanopartículas se purifican mediante una columna magnética LS de Miltenyi Biotec. La preparación de conjugados de proteína y nanopartículas de óxido de hierro incluye la adición de proteínas y la nanopartícula de hierro a un pH tamponado de 6,2-6,5 (NaCl 0,15 M y EDTA 2 mM), agitando a temperatura ambiente durante 12-14 horas, y purificando las partículas conjugadas con proteínas mediante columna magnética LS de Miltenyi Biotec.

35 Se debería entender que, aunque la invención que se reivindica se ha desvelado específicamente mediante realizaciones preferentes y características opcionales, la modificación, mejora y variación de las invenciones reivindicadas que se incorporan en el presente documento pueden ser recurridas por los expertos en la materia, y se considera que tales modificaciones, mejoras y variaciones están dentro del alcance de la invención que se reivindica. Los materiales, métodos y ejemplos que se proporcionan en el presente documento son representativos de las realizaciones preferentes, son a modo de ejemplo y no pretenden ser limitaciones en el alcance de la invención que se reivindica.

45 La invención que se reivindica se ha descrito de manera amplia y genérica en el presente documento. Cada una de las especies y agrupaciones subgenéricas más estrechas que se incluyen en la divulgación genérica también forman parte de la invención reivindicada. Esto incluye la descripción genérica de la invención reivindicada con una condición o limitación negativa que elimina cualquier materia objeto del género, independientemente de si el material suprimido se menciona o no específicamente en el presente documento.

50 Además, cuando las características o aspectos de la invención que se reivindica se describen en términos de grupos de Markush, los expertos en la materia reconocerán que la invención reivindicada también se describe de este modo en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.

55 El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para hacer referencia a "y/o" a menos que explícitamente se indique que se refiere solo a alternativas o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación apoya una definición que se refiere solo a alternativas e "y/o".

60 Como se usa en la presente memoria descriptiva y reivindicación o reivindicaciones, los términos "que comprende" (y cualquier forma de comprender, tal como "comprender" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de tener, como "tener" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de incluir, como "incluye" e "incluir") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, como "contiene" y "contener") son inclusivos o de extremos abiertos y no excluyen elementos o etapas del método adicionales, sin mencionar.

65 A lo largo de la presente divulgación, se hace referencia a diversas publicaciones, patentes y memorias descriptivas de patentes publicadas mediante una cita de identificación. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, será el control.

Tabla 1. Conectores de PEG funcionalizado

Código de Conector	Tipos de Nanopartícula	Conectores de PEG	P.M. (kDa)	Grupo funcional	Estructura
A1	Nanopartícula de oro (GNP-C)	Tiol-PEG-carboxilo	3,5	Amina (-NH ₂)	
A2	Nanopartícula de oro (GNP-N)	Tiol-PEG-amina	3,5	Carboxilo (-COOH)	
S1	Nanopartícula de óxido de hierro (SFP-C)	Dopamina-PEG-carboxilo	3,5	Carboxilo (-COOH)	
S2	Nanopartícula de óxido de hierro (SFP-N)	Dopamina-PEG-amina	3,5	Amina (-NH ₂)	
S3	Nanopartícula de óxido de hierro (SFP-Z)	Dopamina-PEG-azida	3,5	Azida (-N ₃)	
S4	Nanopartícula de óxido de hierro (SFP-M)	Dopamina-PEG-maleimida	3,5	Maleimida	
S5	Nanopartícula de óxido de hierro (SFP-O)	Dopamina-PEG-Ortopiridil disulfuro	3,5	Ortopiridil disulfuro	
P1	Nanopartícula de óxido de hierro (PF-C)	carboxilo-PEG-carboxilo	2,0	Carboxilo (-COOH)	
P2	Nanopartícula de óxido de hierro (PF-N)	Metoxi-PEG-amina	2,0	Amina (-NH ₂)	
P3	Nanopartícula de óxido de hierro (PF-M)	Metoxi-PEG-maleimida	2,0	Maleimida	
P4	Nanopartícula de óxido de hierro (PF-O)	Metoxi-PEG-Ortopiridil disulfuro	2,0	Ortopiridil disulfuro	
P5	Nanopartícula de óxido de hierro (PF)	PEG	2,0	Hidroxilo (-OH)	

5

Tabla 2. Diseños de nanopartículas y capacidad de unión a pMHC.

Síntesis de la nanopartícula				Conjugación con pMHC			
Tipo	Tamaño	Conector	Precipitación/	Enlace	Capacidad de	Orientación	Purificación

ES 2 730 273 T3

	(nm)	(Código)	Agregación		unión a pMHC (pMHC/NP)		magnética
Oro GNP-C	14 ± 2	A1	No	Amida	200	Aleatoria	No
Oro GNP-N	14 ± 2	A2	No	Amida	263	Aleatoria	No
Oro GNP-C	40 ± 6	A1	No	Amida	5.250	Aleatoria	No
Óxido de hierro SFP-C	7,4 ± 1,2	S1	No	Amida	54	Aleatoria	No
Óxido de hierro SFP-N	7,4 ± 1,2	S2	Sí	Amida	31	Aleatoria	No
Óxido de hierro SFP-Z	7,4 ± 1,2	S3	No	Triazol	50	Aleatoria	Lenta
Óxido de hierro SFP-M	7,4 ± 1,2	S4	Sí	Carbono- Sulfuro	< 10	Direccional	No
Óxido de hierro SFP-O	7,4 ± 1,2	S5	No	Disulfuro	< 5	Direccional	No
Óxido de hierro PF-C	14,6 ± 3,8	P1	No	Amida	56	Aleatoria	No
Óxido de hierro PF-N	20,4 ± 4,2	P2	Sí	Amida	210	Aleatoria	No
Óxido de hierro PF-M	23,5 ± 4,9	P3	No	Carbono- Sulfuro	64	Direccional	Eficaz
Óxido de hierro PF-O	No formado	P4	NA	Disulfuro	NA	Direccional	NA
Óxido de hierro PF	10,8 ± 2,7	P5	No	Ninguno	0	NA	No

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para preparar nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas con PEG que comprende la descomposición térmica de acetilacetonato de hierro en presencia de moléculas de PEG funcionalizado o en presencia de moléculas de PEG funcionalizado y éter bencílico, y en el que la temperatura para la descomposición térmica es entre 80 y 300 °C.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la descomposición térmica produce nanopartículas de óxido de hierro solubles en agua y en el que opcionalmente la descomposición térmica se lleva a cabo de 1 a 2 horas.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la descomposición térmica comprende una reacción de una sola etapa.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en el que la descomposición térmica se lleva a cabo en presencia de moléculas de PEG y éter bencílico.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el método comprende además la purificación de las nanopartículas con una columna magnética.
- 20 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la temperatura para la descomposición térmica es de 80 a 200 o de 80 °C a 150 °C.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la temperatura para la descomposición térmica es de 100 a 250 °C o de 100 a 200 °C.
- 25 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la temperatura para la descomposición térmica es de 150 a 250 °C.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el PEG está funcionalizado con maleimida.
- 30 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el método se lleva a cabo en ausencia de un tensioactivo que no contiene PEG.

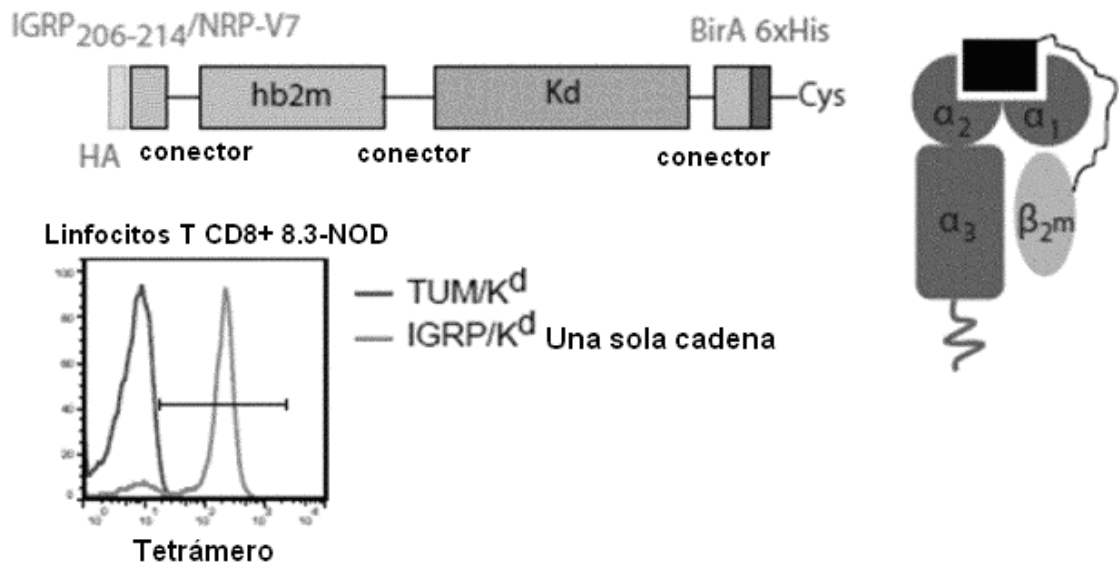


FIG. 1A

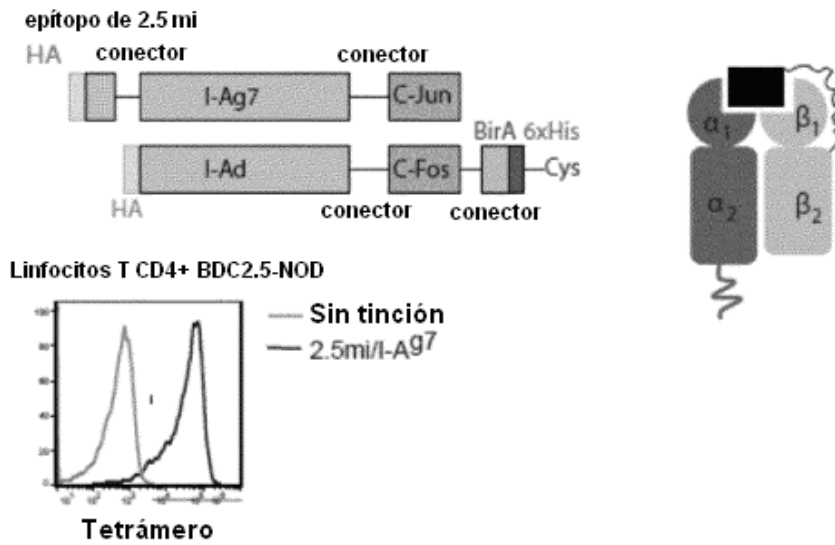


FIG. 1B

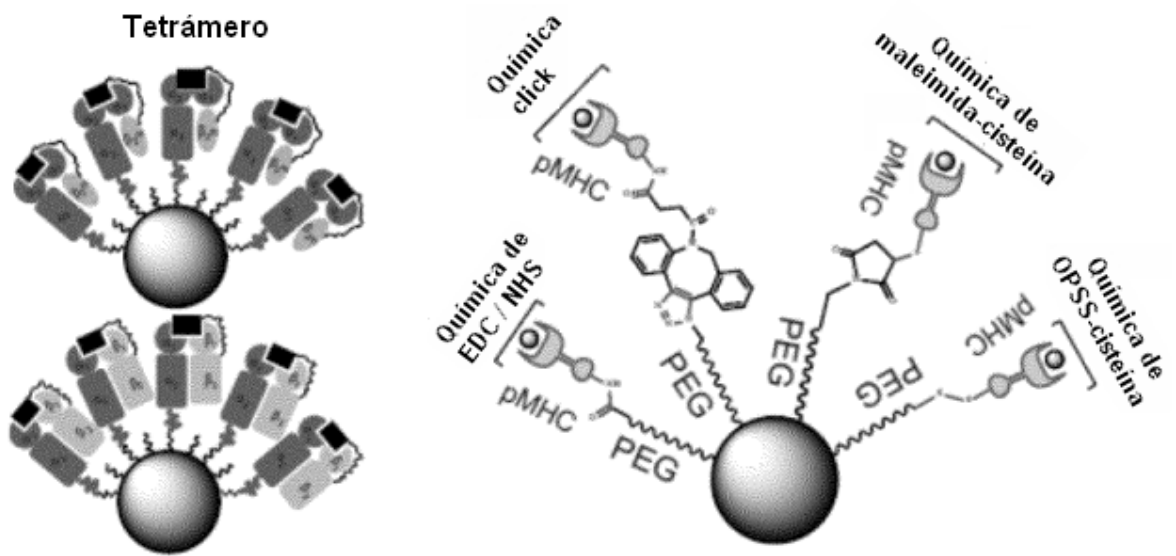
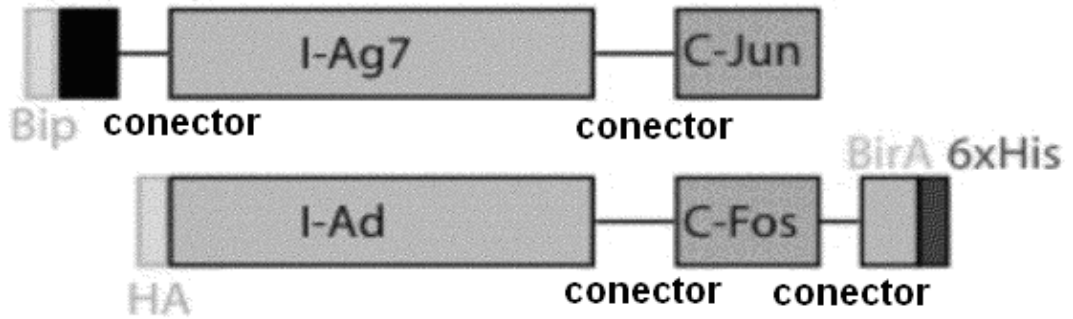


FIG. 1C

epítopo de 2.5 mi



Linfocitos T CD4+ -BDC2.5
(específico de 2.5 mi)

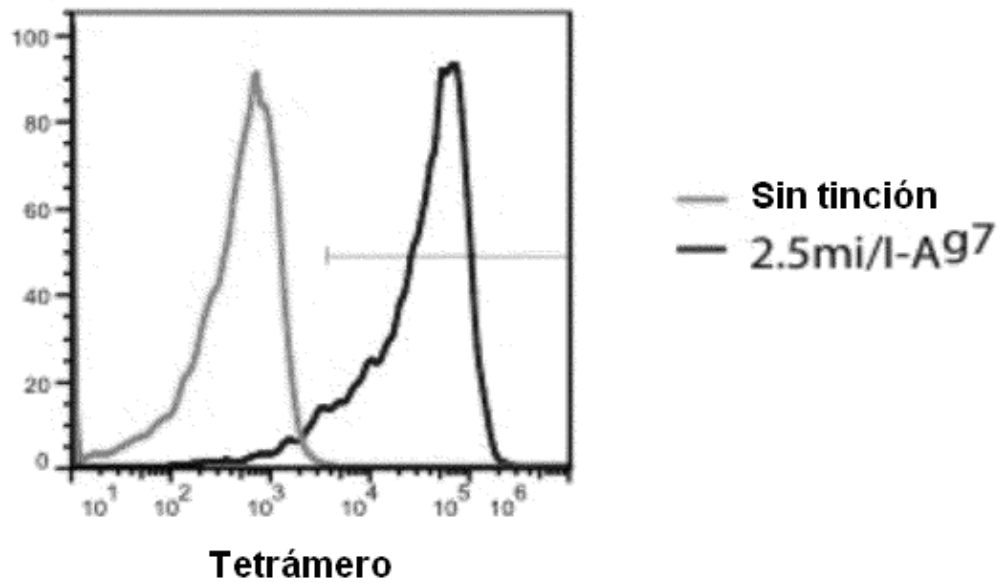


FIG. 2

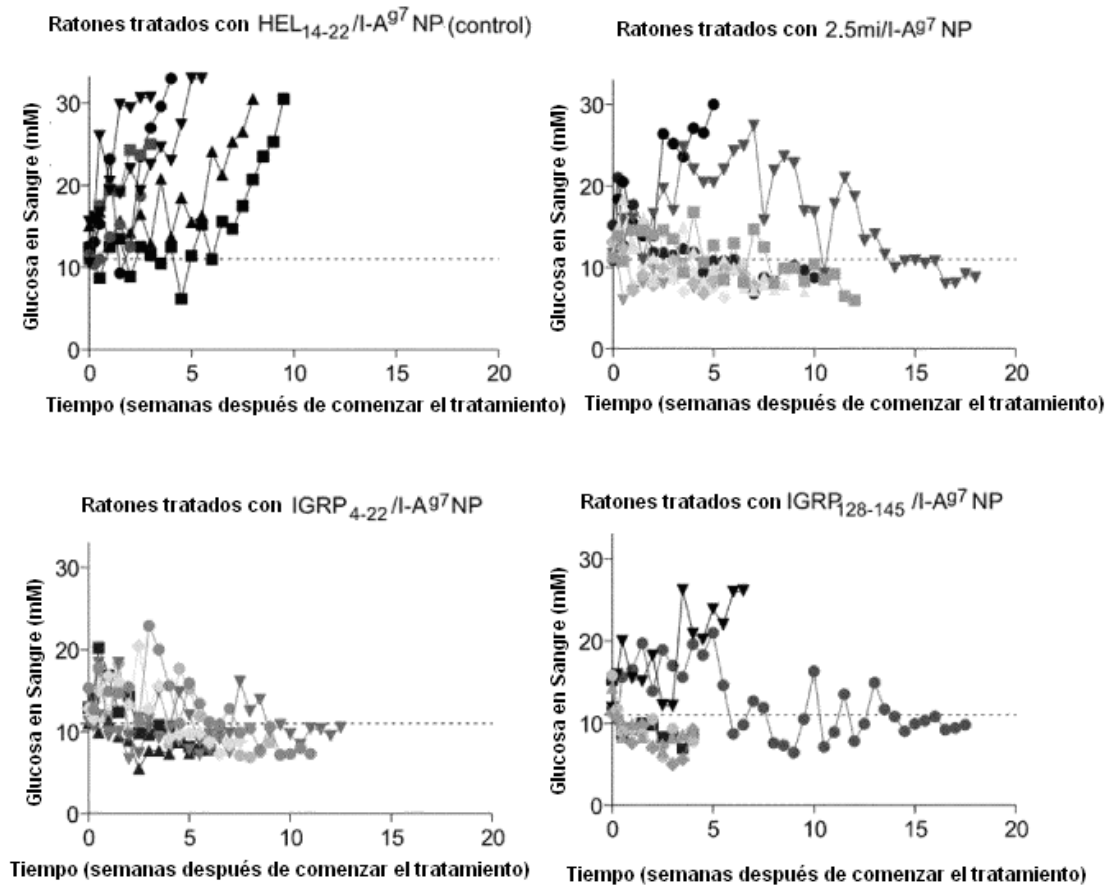


FIG. 3A

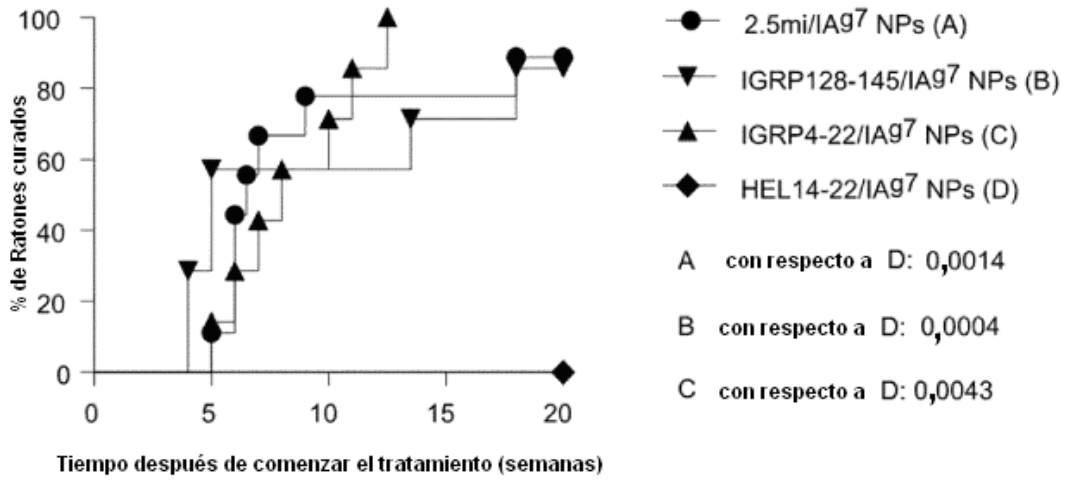


FIG. 3B

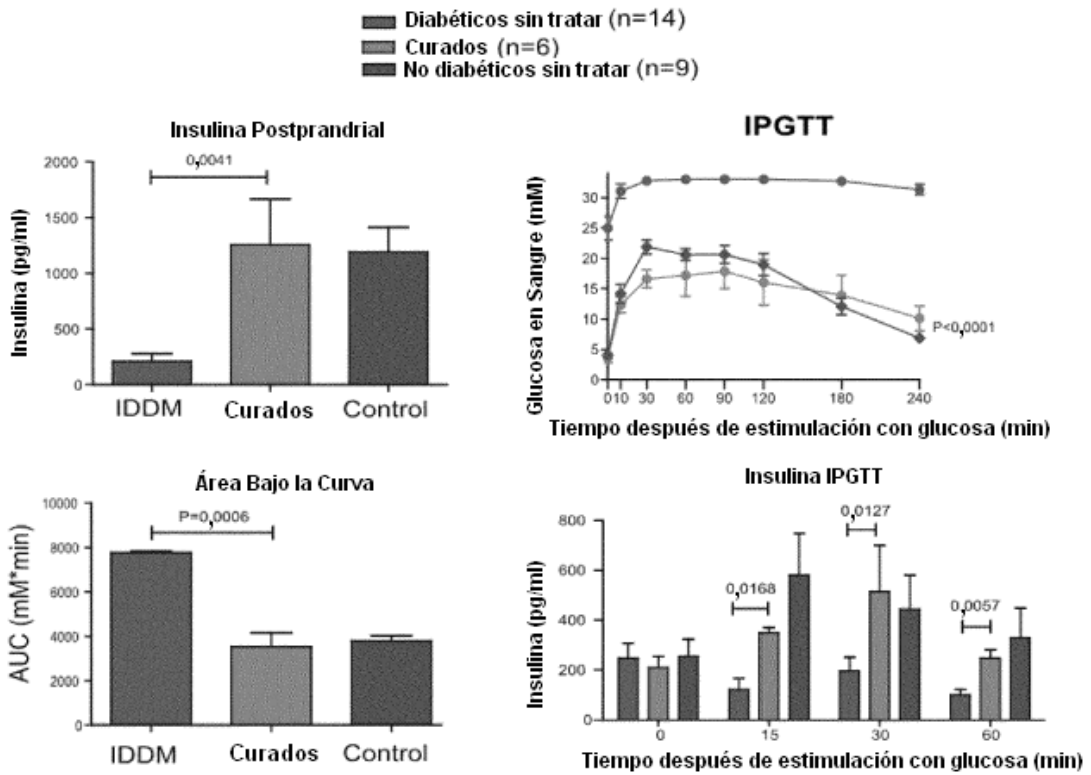


FIG. 4

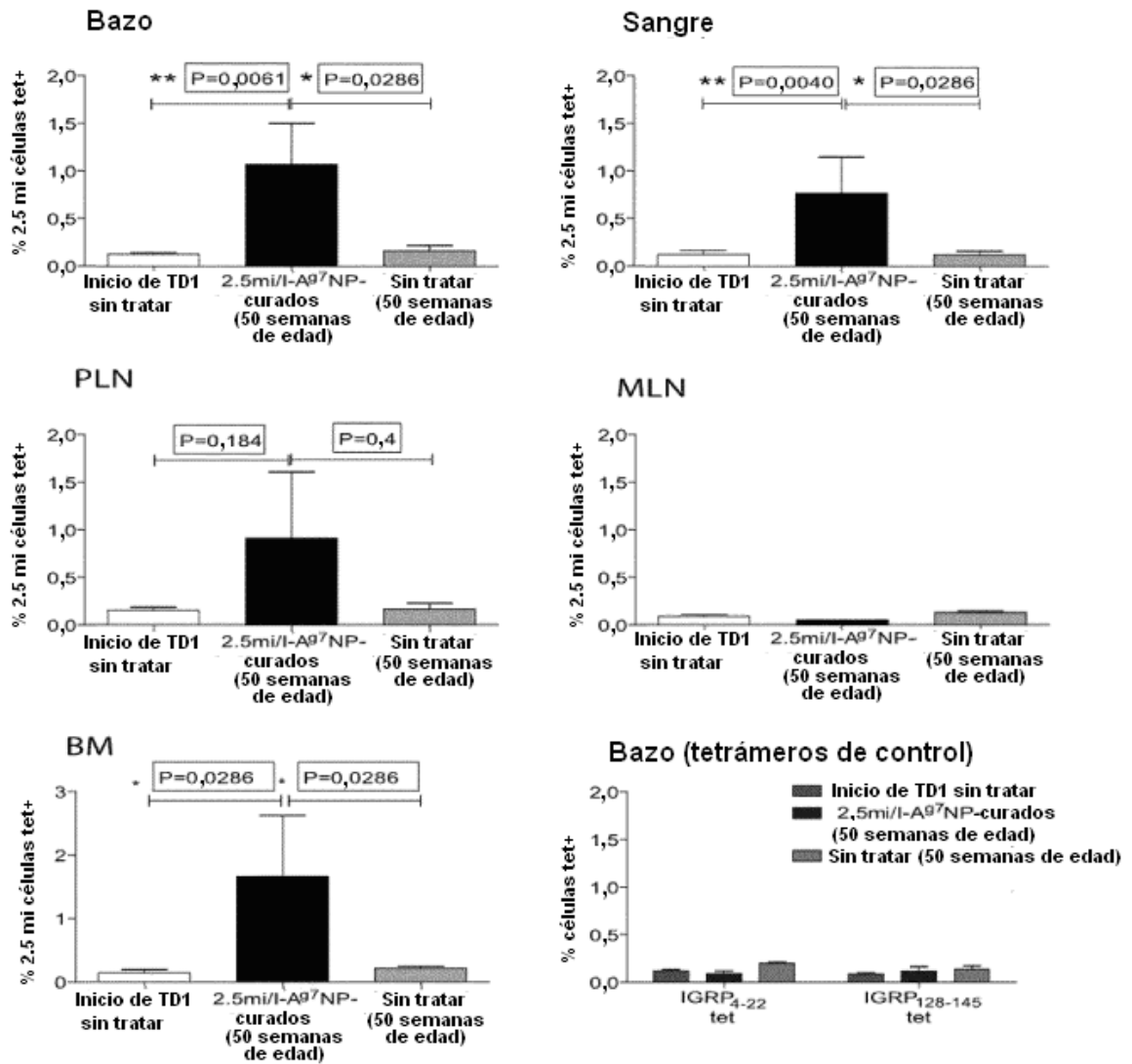


FIG. 5

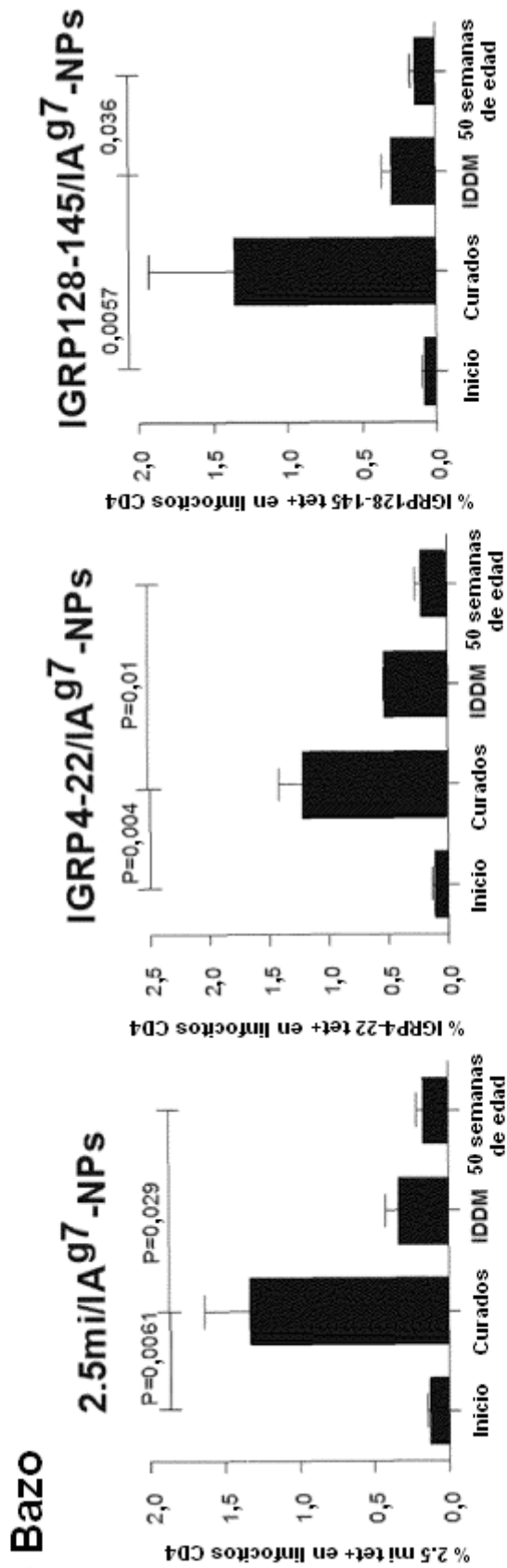


FIG. 6

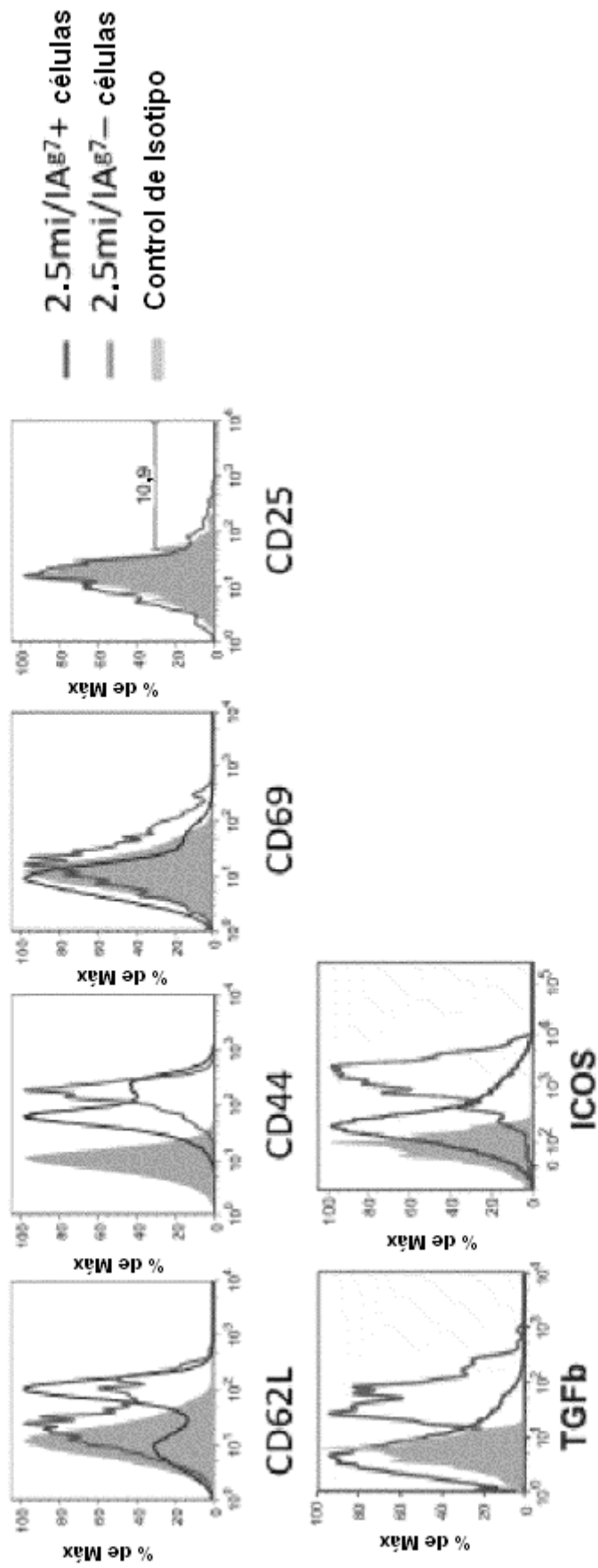
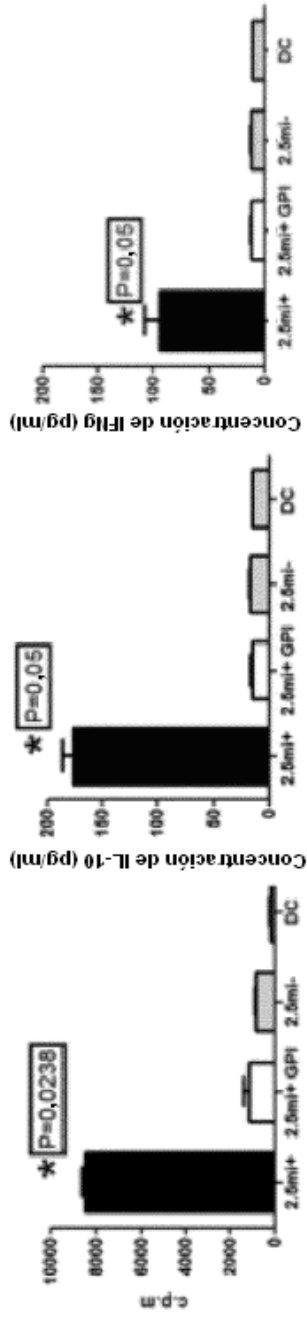
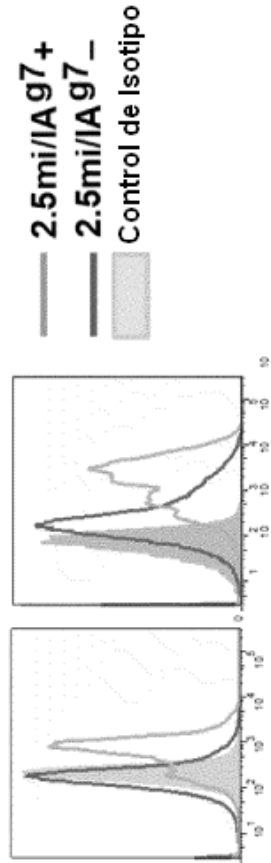


FIG. 7



CD62L bajo/CD44 alto /CD25⁻/ICOS⁺/TGFB β ⁺/IL-10⁺/IFN γ ⁺



CD49b⁺/LAG3⁺

FIG. 7 (CONT)

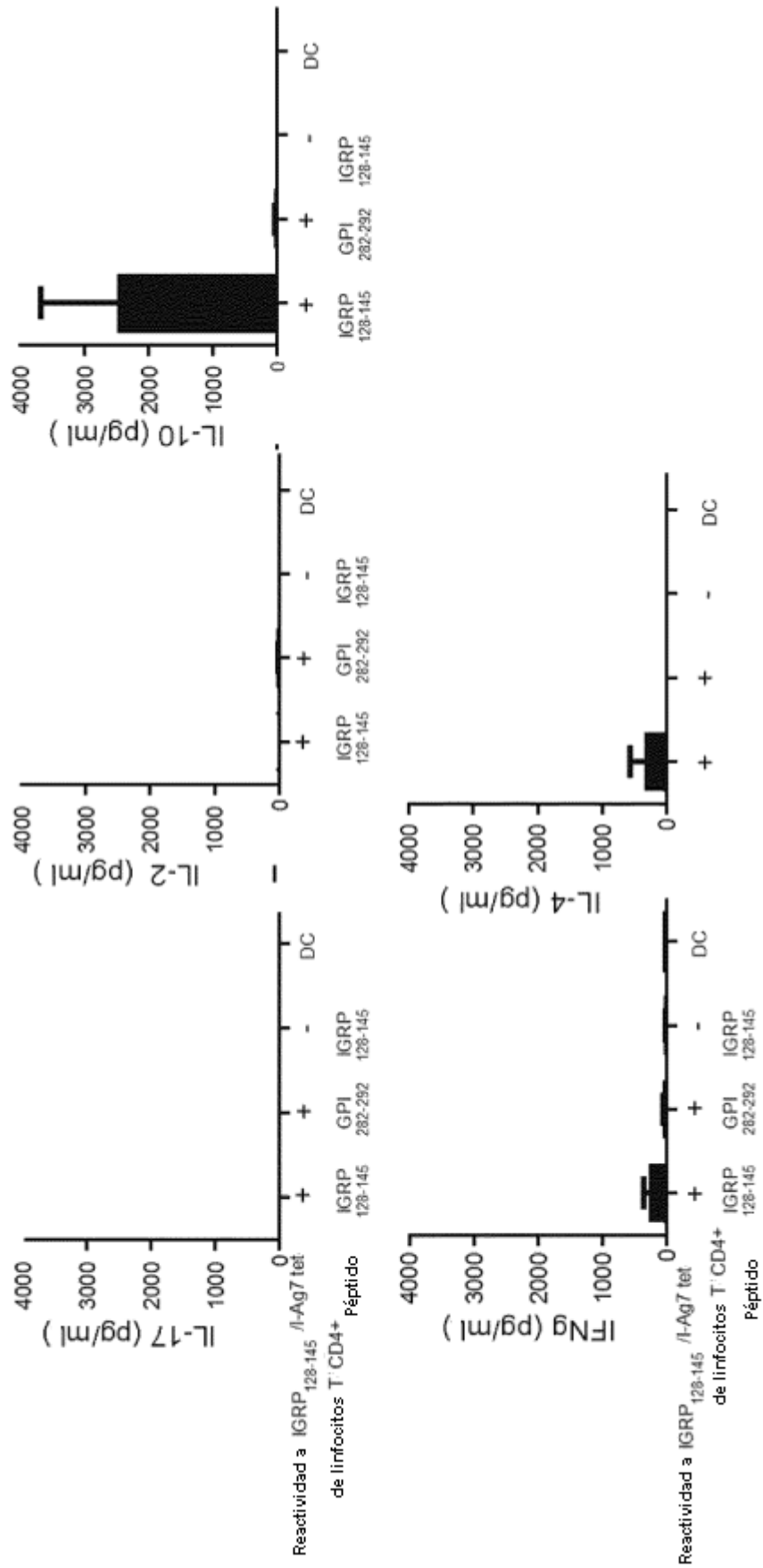


FIG. 8

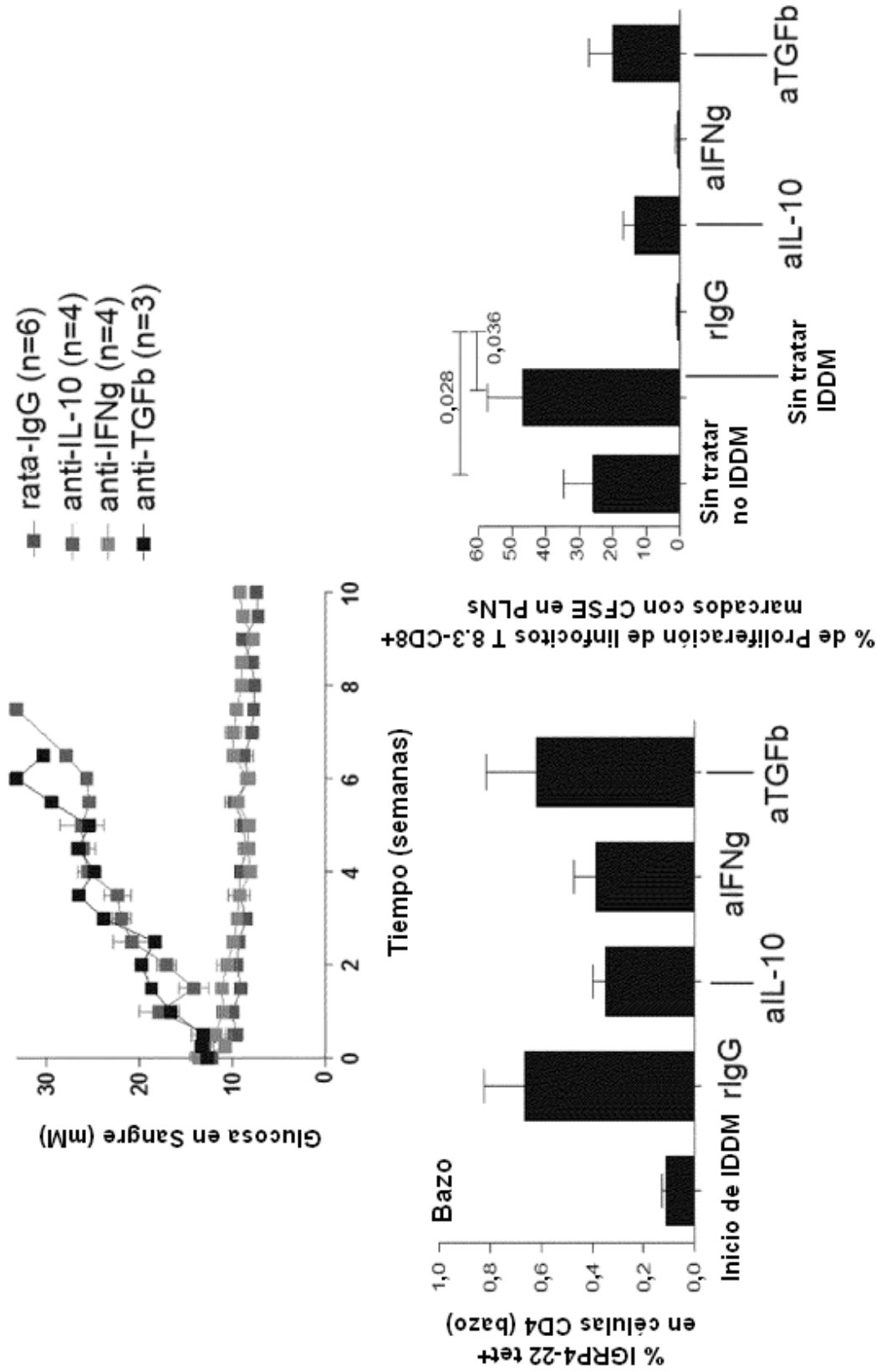


FIG. 9

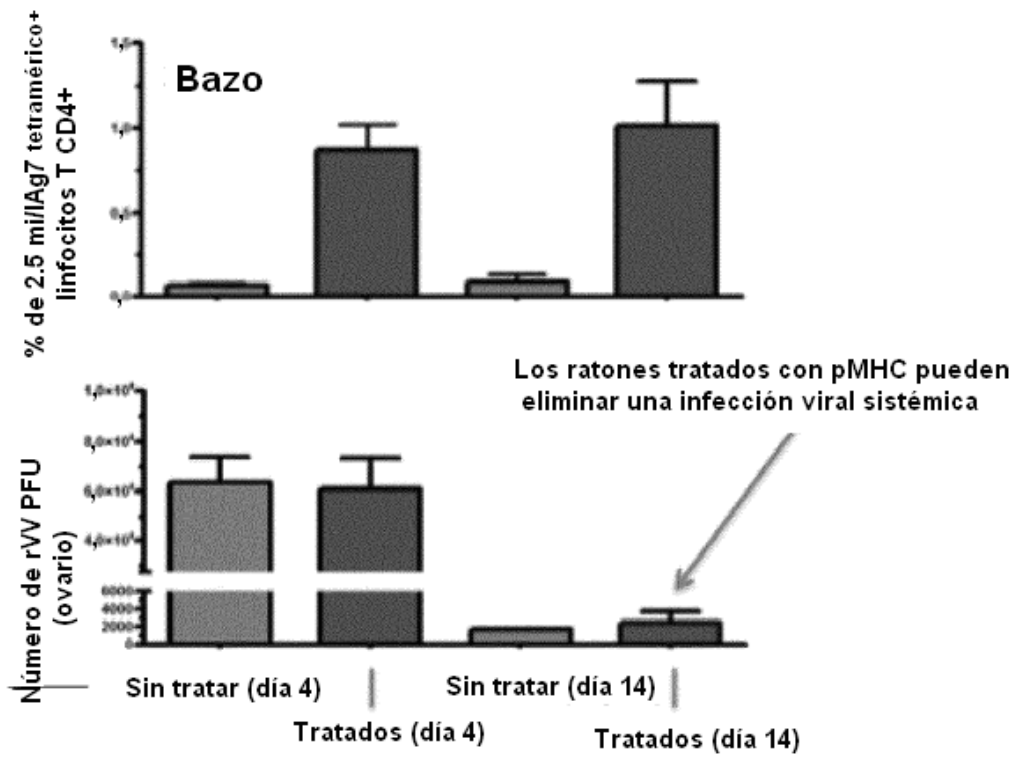


FIG. 10A

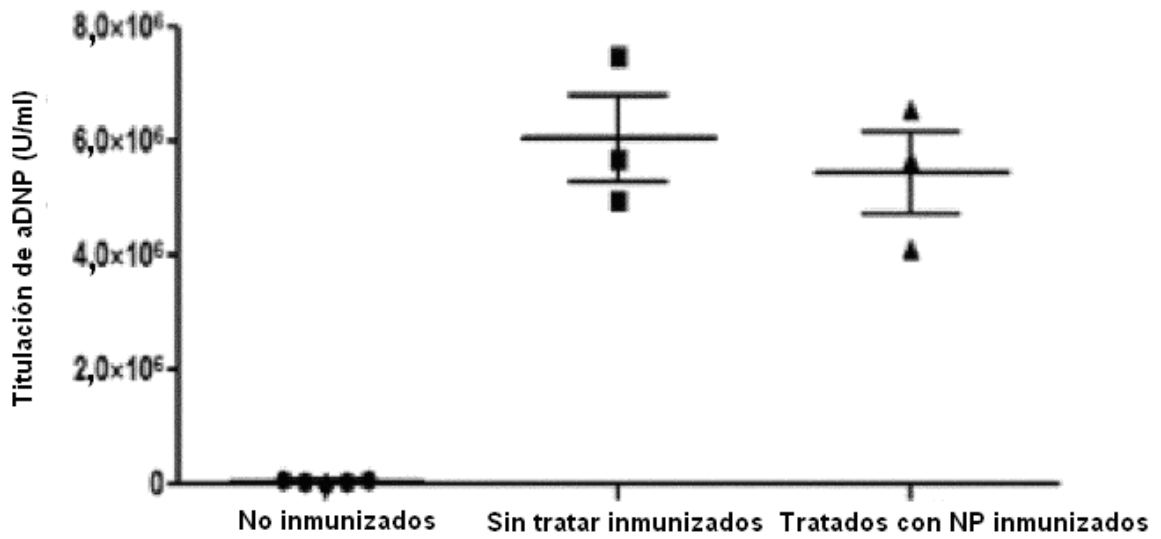


FIG. 10B

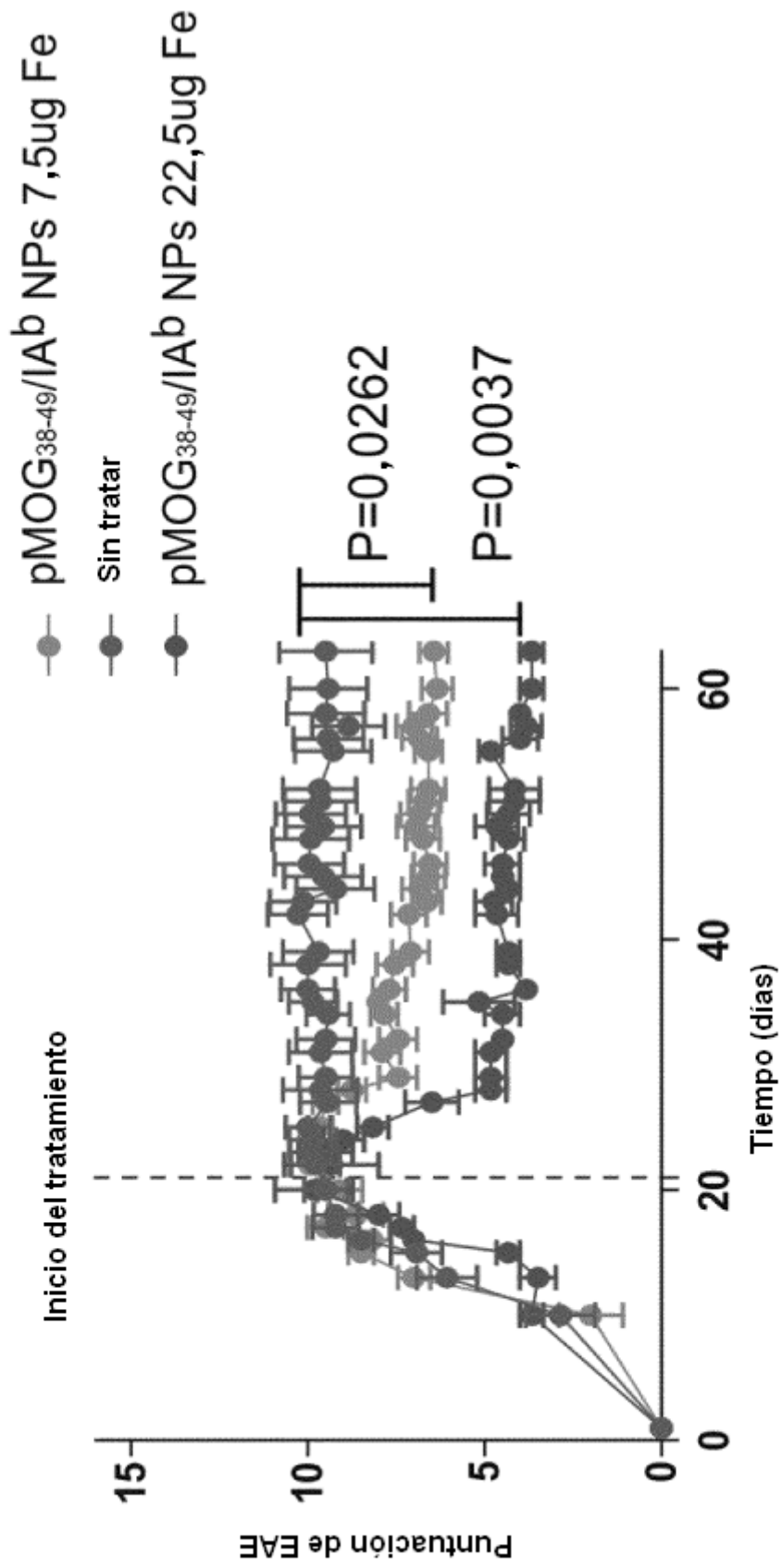


FIG. 11

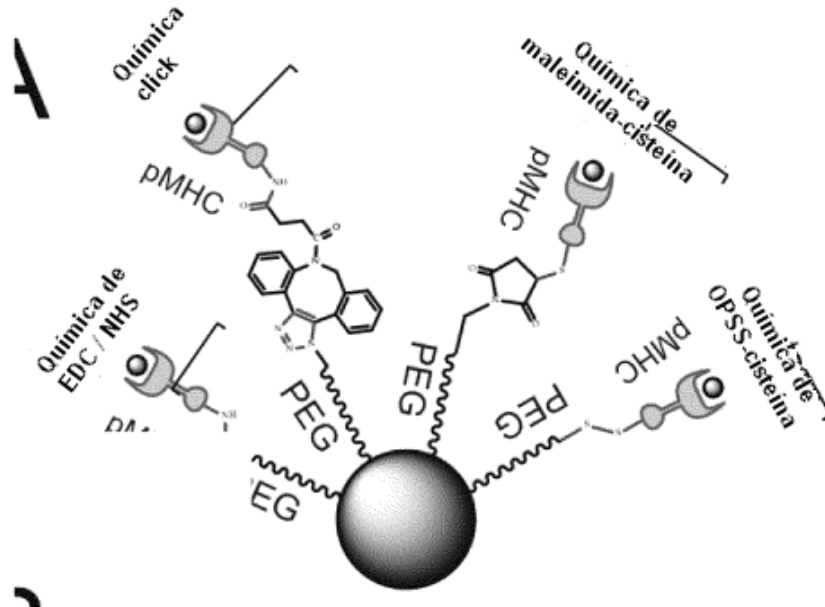


FIG. 12A

TEM

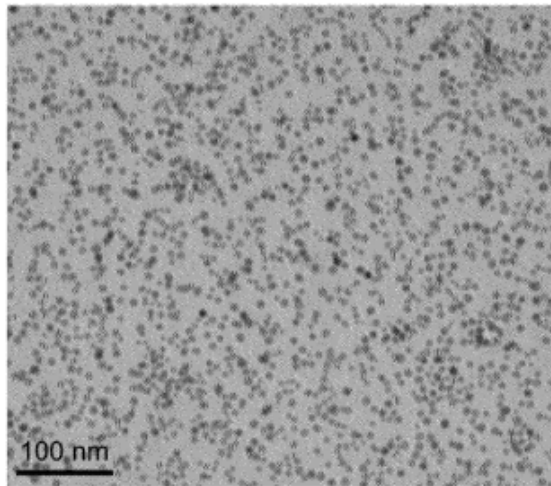


FIG. 12B

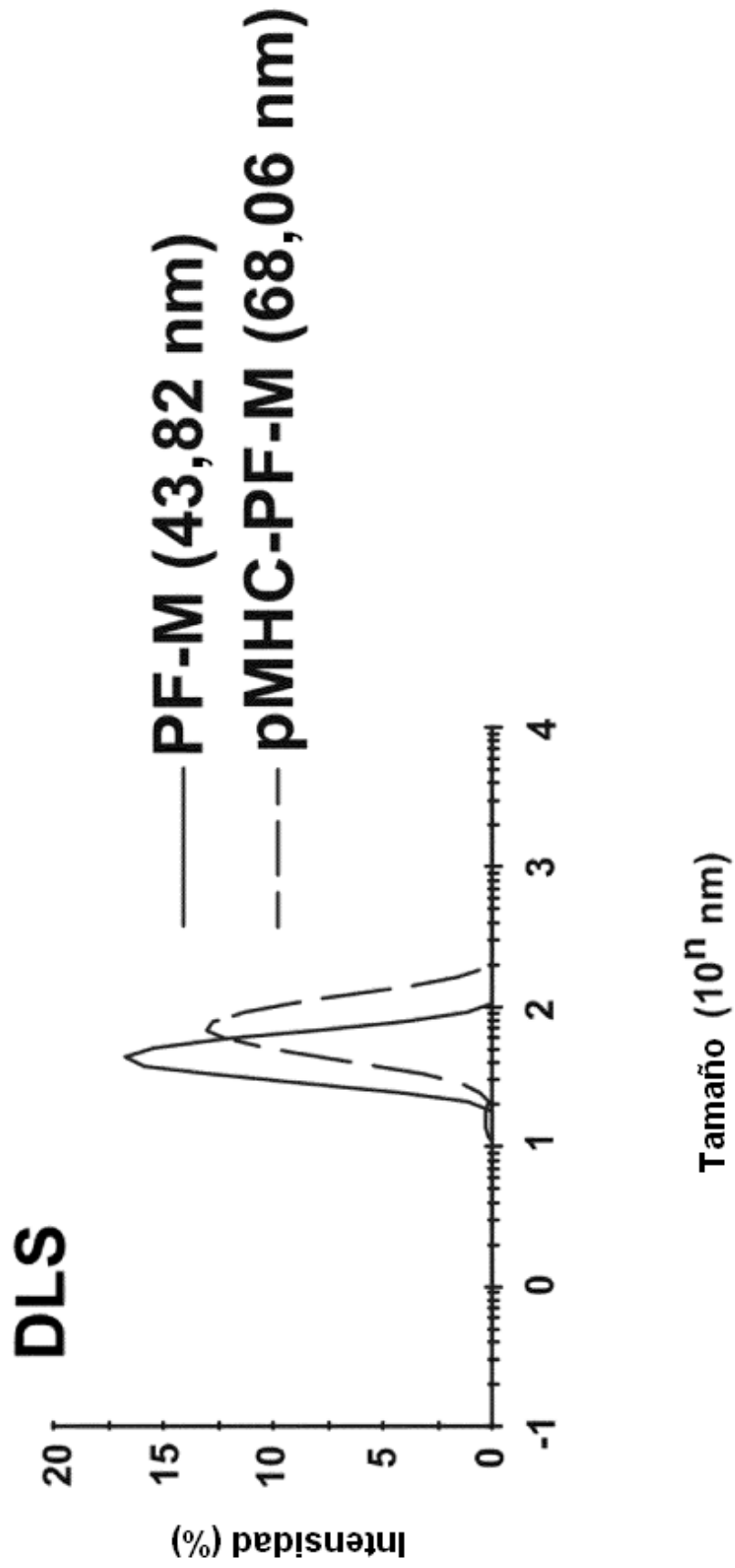


FIG. 12C

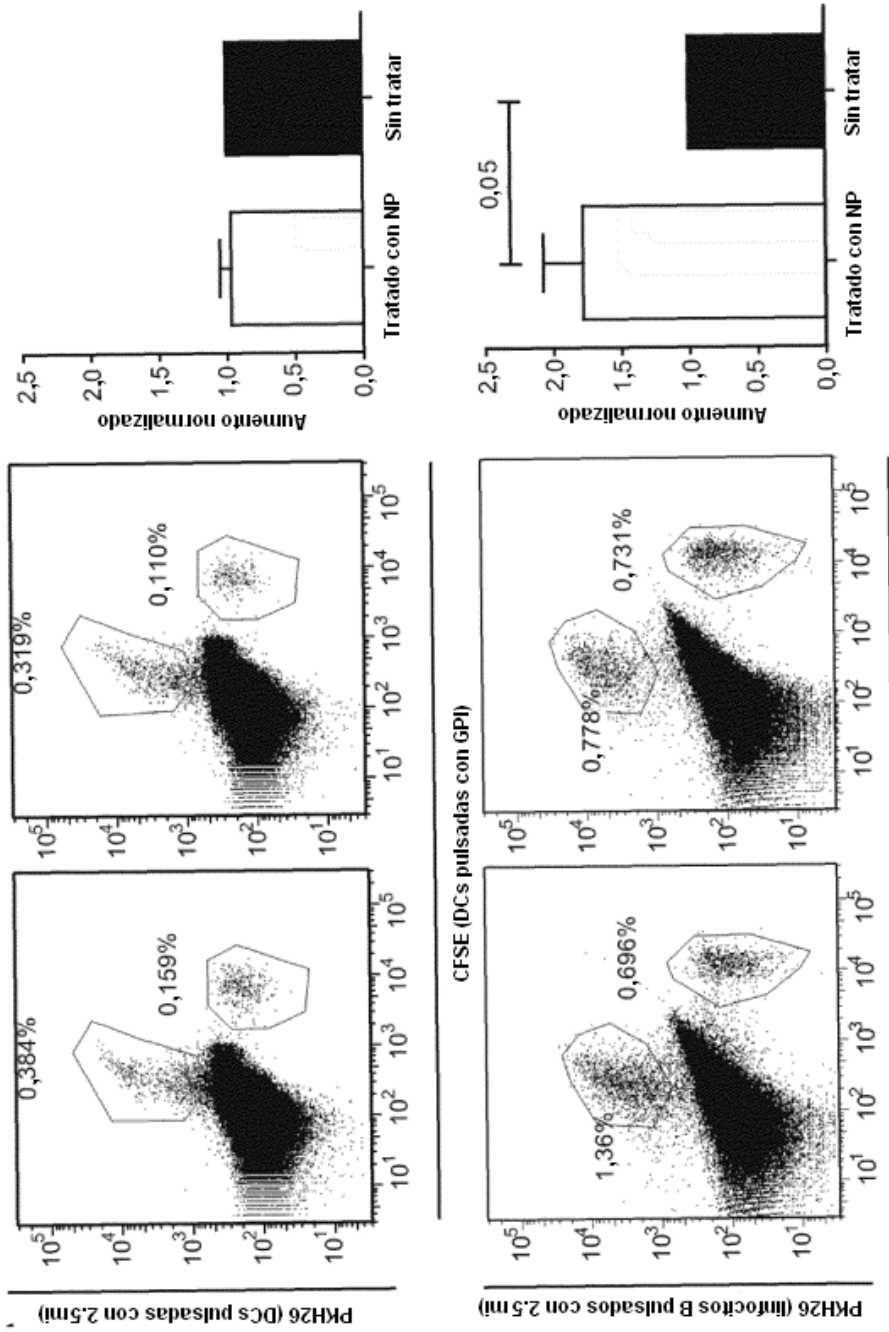


FIG. 13A

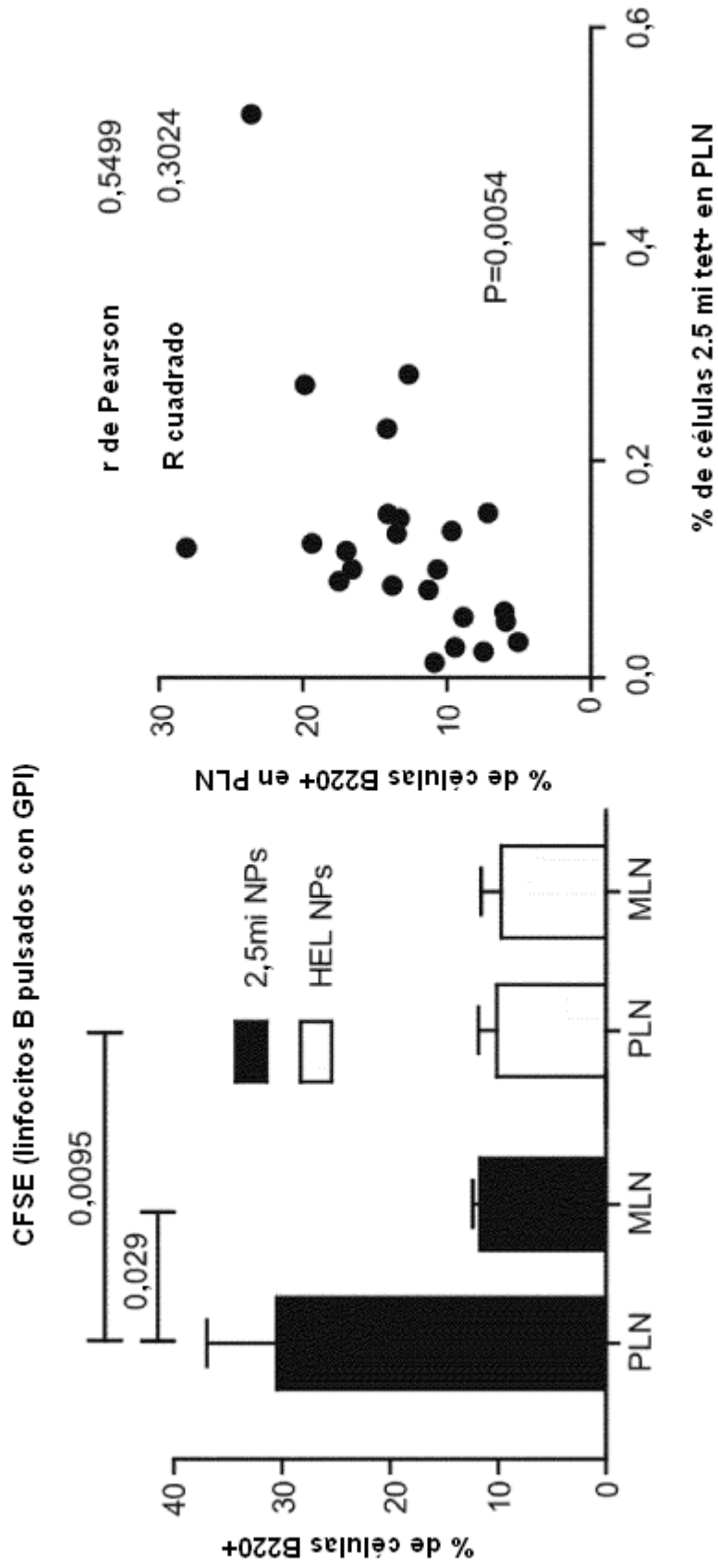


FIG. 13B

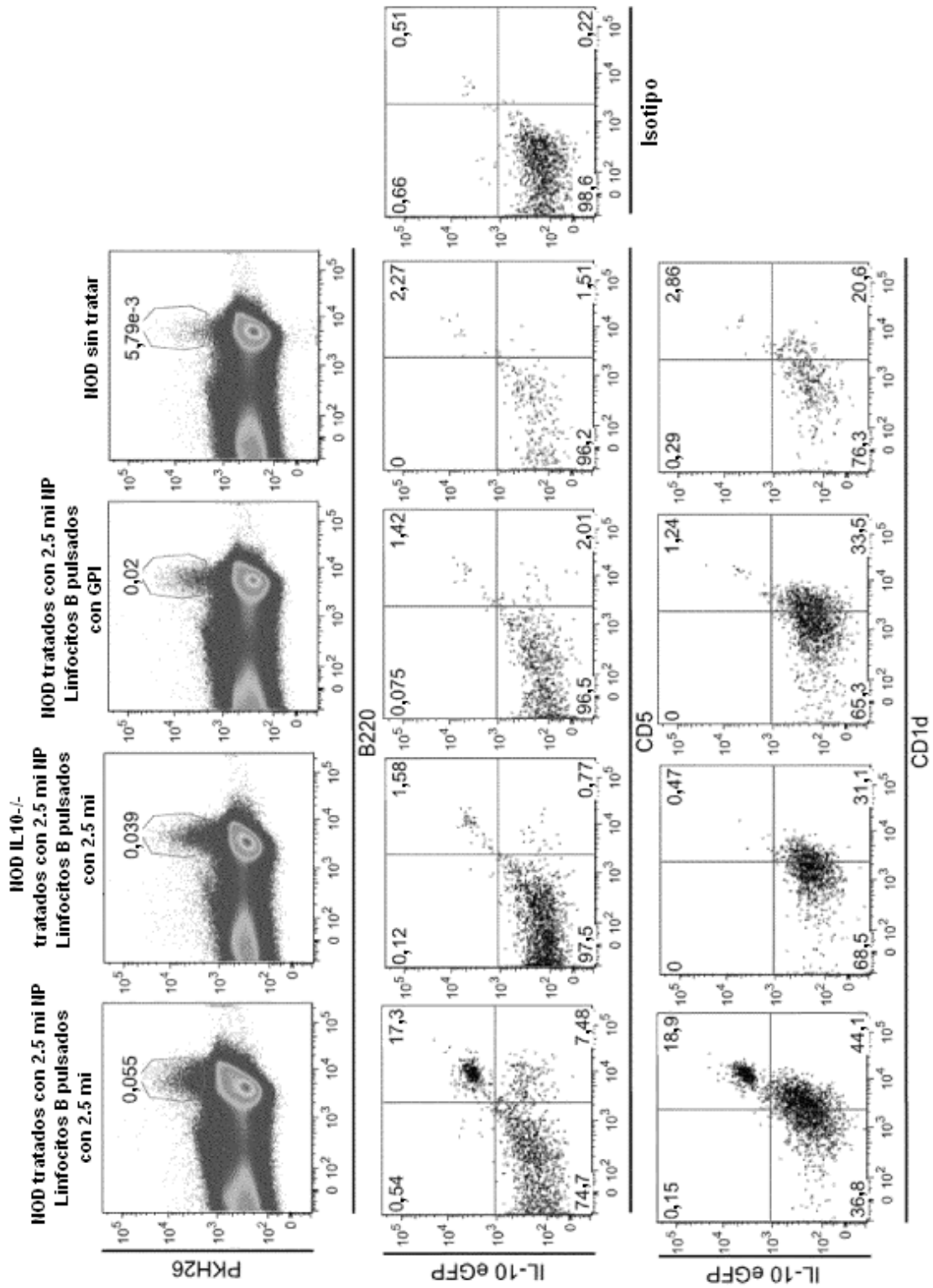
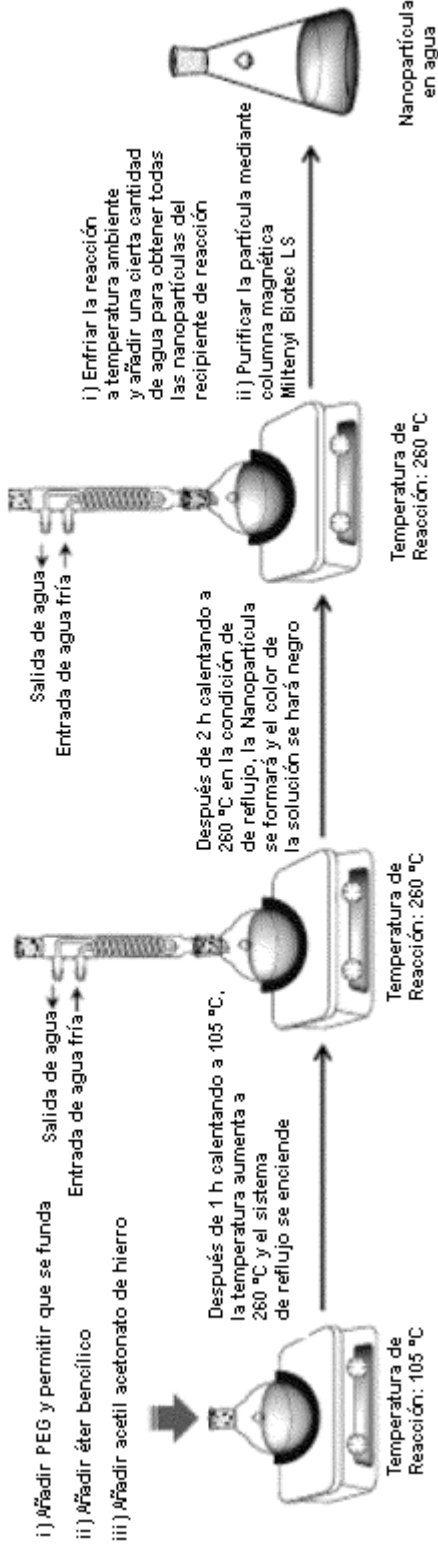


FIG. 13C

Síntesis en Una Etapa de Nanopartícula de óxido de Hierro con Superficie funcionalizada mediante Descomposición Térmica de Acetilacetato de Hierro en Presencia de éter Bencílico y Metoxi-PEG-Maleimida



Bosquejo químico para conjugación de proteína sobre superficie de nanopartícula de óxido de hierro mediante reacción de cisteína-maleimida

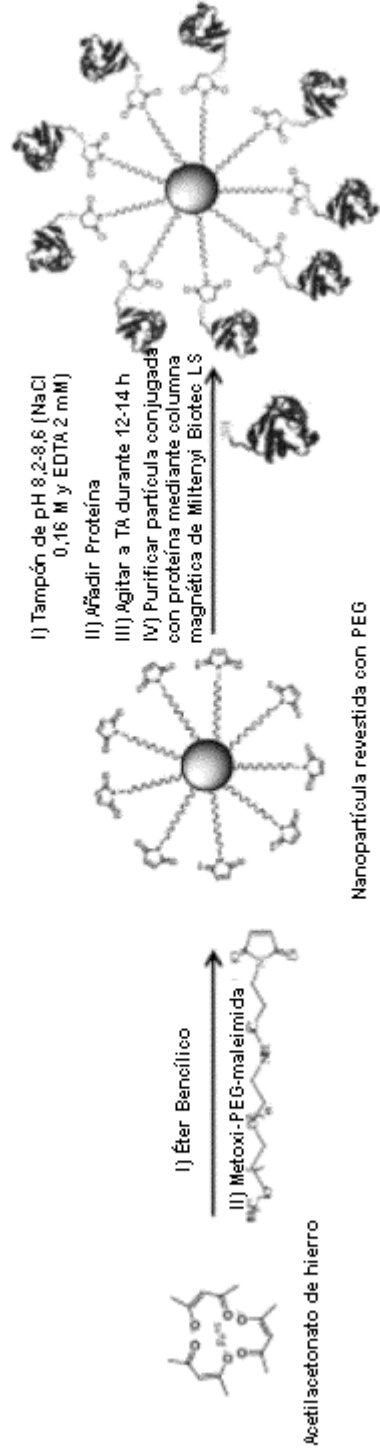


FIG. 14