

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 481**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/00** (2006.01)

**A61K 39/385** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2013 PCT/US2013/047079**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13192532**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2013 E 13807832 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2863942**

54 Título: **Partículas peptídicas conjugadas**

30 Prioridad:

**21.06.2012 US 201261662687 P**

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

**23.01.2020**

73 Titular/es:

**NORTHWESTERN UNIVERSITY (100.0%)  
633 Clark Street  
Evanston, IL 60208, US**

72 Inventor/es:

**SHEA, LONNIE D.;  
MILLER, STEPHEN D.;  
YAP, JONATHAN WOON TECK;  
GETTS, DANIEL R. y  
MCCARTHY, DERRICK**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

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

ES 2 738 481 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

Partículas peptídicas conjugadas

**Antecedentes de la invención**

5 Las enfermedades y trastornos inflamatorios son afecciones en las que una respuesta inflamatoria anormal o desregulada contribuye a la etiología o gravedad de la enfermedad. Los ejemplos incluyen enfermedades autoinmunes como la diabetes tipo 1 y la enfermedad celíaca.

10 Muchas de estas enfermedades se caracterizan por una infiltración de células mononucleares en un sitio de lesión tisular u otro insulto. Los ejemplos de células mononucleares que se han observado en estas infiltraciones incluyen linfocitos, especialmente linfocitos T, y células del sistema de fagocitos mononucleares (células MPS), tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas, células microgliales y otros.

15 Se sospecha que muchas de las células observadas en los infiltrados de células mononucleares tienen un papel en estas respuestas inflamatorias anormales. Por ejemplo, en enfermedades como la esclerosis múltiple, se sabe que las células T CD4<sup>+</sup> desempeñan un papel central en la respuesta autoinmune patológica. En un momento anterior en la activación de las células T, las células dendríticas y otras células MPS pueden ser responsables de la activación de las células T CD4<sup>+</sup>. Las células MPS también podrían contribuir a la inflamación a través de la fagocitosis, aunque en al menos algunas enfermedades inflamatorias no está claro si tales células serían capaces de esto en ausencia de células T CD4<sup>+</sup>.

20 Los monocitos de sangre periférica se pueden clasificar en uno de dos grupos según la expresión o no de ciertas moléculas de la superficie celular. En particular, se entiende que los "monocitos residentes" humanos o "monocitos maduros" tienen un fenotipo CD14<sup>bajo</sup>CD16<sup>+</sup> (la contraparte del ratón es CX<sub>3</sub>CR1<sup>alto</sup>CCR2<sup>-</sup>Gr1<sup>-</sup>). Se entiende que otro grupo de células, los "monocitos inflamatorios" o "monocitos inmaduros" tienen un fenotipo CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (la contraparte del ratón es CX<sub>3</sub>CR1<sup>bajo</sup>CCR2<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>). (Geissmann F. et al. 2003 Immunity 19: 71-82).

25 De manera destacable, aunque se entiende que estos últimos son "inflamatorios" en el sentido de que se observa que migran hacia el tejido inflamado de las células de la sangre periférica derivadas de la médula ósea, no se ha demostrado que estas células causen inflamación, ni directamente ni a través de la acción de otras células. Además, las diversas células MPS que pueden formarse cuando estas células se diferencian tampoco se ha demostrado que causen inflamación.

30 Las estrategias clínicas convencionales para la inmunosupresión general a largo plazo en trastornos asociados con respuestas inmunes no deseadas se basan en la administración a largo plazo de medicamentos inmunosupresores de acción amplia, por ejemplo, bloqueadores de la señal 1 como la ciclosporina A (CsA), FK506 (tacrolimus) y corticosteroides. El uso prolongado de altas dosis de estos medicamentos puede tener efectos secundarios tóxicos. Además, incluso en aquellos pacientes que son capaces de tolerar estos medicamentos, el requisito de una terapia farmacológica inmunosupresora de por vida conlleva un riesgo significativo de efectos secundarios graves, que incluyen tumores, infecciones graves, nefrotoxicidad y trastornos metabólicos.

35 Se han desarrollado métodos para inducir la tolerancia específica de antígeno, incluido el acoplamiento celular de un antígeno o péptido. Por ejemplo, en un método, la tolerancia acoplada a células inducidas por péptidos involucró la recolección, separación y tratamiento de células de sangre periférica con autoantígenos específicos de la enfermedad y el reactivo de acoplamiento de etileno carbodimida (EDCI) en condiciones estériles, y la posterior re-infusión en el donante/paciente. Este proceso es costoso y debe ser realizado bajo condiciones estrechamente monitoreadas por profesionales expertos y está limitado en el número de centros que pueden realizar el procedimiento. El uso de glóbulos rojos a medida que el tipo de célula donante amplía la fuente potencial para incluir donantes alogénicos, lo que aumenta el suministro de células fuente drástica y potencialmente expandiendo la administración de esta terapia a cualquier entorno certificado para transfusiones de sangre. Estos enfoques tienen limitaciones significativas en términos de suministro de células de origen y la necesidad de que el tipo de tejido coincida para minimizar la respuesta inmune frente a las células del donante. Además, el tratamiento local de las células para acoplar autoantígenos a través de EDCI presenta un importante problema de control de calidad. Además, estos enfoques también requieren al menos algún conocimiento del antígeno patológico para el que se busca la tolerancia inmune.

50 Recientemente, se han descrito partículas acopladas a péptidos que eliminan el requisito de un suministro de células fuente y eluden el requisito de tipificación de tejidos de los enfoques anteriores. Véase el documento WO 2010/085509, incorporado en este documento como referencia en su totalidad. Sin embargo, estos enfoques todavía dependen de la tolerancia inmune específica de antígeno.

55 La tolerancia específica al antígeno generalmente no es ideal porque los antígenos/epítotos específicos generalmente no se conocen en las enfermedades humanas. Además, los antígenos pueden variar de un sujeto a otro para que un enfoque específico de antígeno sea efectivo, por lo tanto, sería necesario determinar qué antígenos reconocería cada paciente individual o requeriría un acoplamiento de una biblioteca de posibles péptidos a las

partículas antes de administración. La síntesis y el acoplamiento individual de estos péptidos requieren mucho tiempo y son costosos.

5 Por lo tanto, existe la necesidad de una terapia que resuelva ambos problemas, eliminando así la necesidad de una fuente de células de tejido compatible y, al mismo tiempo, eliminando la necesidad de sintetizar y acoplar grandes paneles de péptidos.

10 El documento WO 2009/051837 A2 describe composiciones y sistemas para el suministro de nanotransvehículos a células del sistema inmune. El documento describe nanotransvehículos de vacunas capaces de estimular una respuesta inmune en células T y/o células B, en algunas realizaciones, que comprende al menos un agente inmunomodulador, y que comprende opcionalmente al menos un resto de direccionamiento y opcionalmente, al menos, un agente inmunoestimulador.

### Sumario de la invención

La presente invención es como se reivindica en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones y/o ejemplos de la siguiente descripción que no están cubiertos por las reivindicaciones adjuntas se consideran que no son parte de la presente invención.

15 En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona composiciones (por ejemplo, para la inducción de una tolerancia específica de antígeno) que comprenden una partícula vehículo (por ejemplo, partícula de PLG) unida a un péptido antigénico. En ciertas realizaciones, la partícula vehículo es una partícula de poli(láctido-co-glicólido) (PLG).

20 En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona composiciones que comprenden: un antígeno acoplado a una partícula vehículo con un potencial zeta negativo. En algunas realizaciones, el potencial zeta de la partícula es de aproximadamente -100 mV a aproximadamente 0 mV. En algunas realizaciones, el potencial zeta de la partícula es de aproximadamente -50 mV a aproximadamente -40 mV. En algunas realizaciones, la partícula es un copolímero que tiene una relación molar de aproximadamente 80:20 a aproximadamente 100:0. En algunas realizaciones, la relación de copolímeros puede ser, entre otras, poliestireno:poli(carboxilato de vinilo)/80:20, poliestireno:poli(carboxilato de vinilo)/90:10, poli(carboxilato de vinilo):poliestireno/80:20, poli(carboxilato de vinilo):poliestireno/90:10, ácido poliláctico:ácido poliglicólico/80:20, o ácido poliláctico:ácido poliglicólico/90:10. Incluso en otras realizaciones, la partícula es una partícula de poliestireno, una partícula de poliestireno carboxilado, o una partícula de poli(ácido láctico-co-glicólico). En algunas realizaciones, la partícula es una partícula de poli(ácido co-glicólico láctico).

30 En algunas realizaciones, la partícula tiene un diámetro de entre aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, la partícula tiene un diámetro de entre aproximadamente 0,3  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, la partícula tiene un diámetro de entre aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, la partícula tiene un diámetro de entre aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, la partícula tiene un diámetro de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$ .

35 En otras realizaciones, el antígeno comprende al menos una porción de un antígeno autoinmune, un antígeno expresado en un tejido para ser trasplantado en un sujeto, o un alérgeno. En algunas realizaciones, el antígeno comprende al menos una porción de proteína básica de mielina, receptor de acetilcolina, antígeno endógeno, glicoproteína de oligodendrocito de mielina, antígeno de células beta pancreáticas, insulina, descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), colágeno tipo 11, cartílago humano gp39, fp130-RAPS, proteína proteolipídica, fibrillarina, pequeña proteína nucleolar, receptor del factor estimulante de la tiroides, histonas, glicoproteína gp70, piruvato deshidrogenasa deshidrolipoamida acetiltransferasa (PCD-E2), antígeno de folículo piloso, A-gliaden e isoforma tropomiosina humana 5, polen de césped Bahia (BaGP), alérgeno de melocotón Pru p 3, alérgeno a la leche alfa 1-Caein, alérgeno al apio Apig1, alérgeno de nuez de Berel de Brasil, alérgeno a la leche de B-lactoglobulina, albúmina de suero bovino, alérgeno de avellana Cor a 1.04, o alérgeno al huevo de ovalbúmina.

45 En otras realizaciones, el antígeno comprende un antígeno autoinmune, un antígeno expresado en un tejido que se transplanta en un sujeto, o un alérgeno. En realizaciones no limitantes, el antígeno comprende, por ejemplo, proteína básica de mielina, receptor de acetilcolina, antígeno endógeno, glicoproteína de oligodendrocito de mielina, antígeno de células beta pancreáticas, insulina, descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), colágeno tipo 11, cartílago humano gp39, fp130-RAPS, proteína proteolipídica, fibrillarina, pequeña proteína nucleolar, receptor del factor estimulante de la tiroides, histonas, glicoproteína gp70, piruvato deshidrogenasa deshidrolipoamida acetiltransferasa (PCD-E2), antígeno del folículo piloso, A-gliaden e isoforma tropomiosina humana 5, polen de césped Bahia (BaGP), alérgeno de melocotón Pru p 3, alérgeno de la leche alfa s 1-Caein, alérgeno de apio Apig1, alérgeno de nuez de Brasil Berel, alérgeno de leche de B-Lactoglobulina, albúmina de suero bovino, Alérgeno de avellana Cor a 1.04, o alérgeno de huevo de ovalbúmina.

55 En algunas realizaciones, el antígeno se acopla a dicha partícula mediante una molécula conjugada. En algunas realizaciones, el antígeno está acoplado a dicha partícula mediante un enlazador. En algunas realizaciones, la molécula conjugada es etileno carbodiimida (ECDI). En algunas realizaciones, el antígeno se acopla al exterior de la

partícula con un potencial zeta negativo. En algunas realizaciones, el antígeno está encapsulado en la partícula que tiene un potencial zeta de superficie negativo.

En algunas realizaciones, la partícula es biodegradable. En algunas realizaciones, la partícula está funcionalizada en la superficie. En algunas realizaciones, la partícula está funcionalizada con una superficie de carboxilato.

5 En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona métodos para inducir tolerancia específica de antígeno en un sujeto que comprende: administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende una partícula acoplada de antígeno a dicho sujeto, en donde dicha partícula tiene un potencial zeta negativo, y en donde dicha partícula y antígeno inducen tolerancia de dicho antígeno en dicho sujeto. En algunas realizaciones, la administración se realiza para tratar o prevenir una enfermedad o afección. En algunas realizaciones, la administración se realiza antes o después del inicio de una enfermedad o afección causada por dicho antígeno. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en: una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, una alergia, un rechazo del trasplante y una respuesta hiperinmune. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en: esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, asma, alergia alimentaria, alergia ambiental, enfermedad celíaca y una afección causada por dicho antígeno en dicho sujeto para reducir una reacción exagerada a dicho antígeno. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además repetir dicha administración de dicha composición en dicho sujeto.

En algunas realizaciones, la composición se administra por vía intravenosa.

20 En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona además un procedimiento para la preparación de una partícula modificada inmune con un potencial zeta negativo, comprendiendo dicho procedimiento: poner en contacto un precursor de partícula modificada inmune con una solución tampón bajo condiciones efectivas para formar la partícula inmune modificada con un potencial zeta negativo. En algunas realizaciones, el precursor de partículas modificadas inmune se forma por copolimerización.

25 En algunas realizaciones, la solución tampón tiene un pH básico. En algunas realizaciones, la solución tampón es bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio, bicarbonato de litio, dihidrógeno fosfato de potasio, dihidrógeno fosfato de sodio o dihidrógeno fosfato de litio.

30 En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona una composición que comprende un antígeno encapsulado dentro del núcleo de un liposoma funcionalizado en la superficie. En una realización más, el liposoma se compone en una proporción 30:30:40 de fosfatidilcolina:fosfatidilglicerol:colesterol. En una realización adicional más, dicho antígeno comprende un antígeno autoinmune, un antígeno expresado en un tejido que se transplanta en un sujeto, o un alérgeno.

### Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 muestra (A) una micrografía de una partícula de poli(lactida-co-glicólido) (PLG). B y C muestran la caracterización de partículas de poli(lactida-co glicólido) funcionalizadas en la superficie mediante análisis de dispersión dinámica de la luz. Las partículas de poli(lactida co-glicólido) funcionalizadas en la superficie se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) con una tasa de conteo de  $2,5 \times 10^5$  conteos por segundo en 18,2 MΩ de agua. La población de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie varió en un 5-15% por lote, pero generalmente tuvo un diámetro Z promedio de 567 nm, un diámetro máximo de 670 nm y un índice de polidispersidad de 0,209.

40 La Figura 2 muestra que las nanopartículas de PLG inducen tolerancia específica de antígeno. La proteína proteolípídica inmunodominante epítipo PLP<sub>139-151</sub> (PLG-PLP<sub>139-151</sub>) se usó para inducir tolerancia para la prevención de la recidiva de la encefalitis autoinmune experimental (R-EAE). Los ratones se trataron con PLP<sub>139-151</sub>-PLGA (N = 5), OVA<sub>323-339</sub>-PLGA (N = 5), o PLGA no conjugado (N = 5) el día -7 en relación con el momento de la inmunización (día 0). La enfermedad máxima se observó típicamente entre el día 12 y 14, y los ratones se clasificaron para analizar la enfermedad clínica. Las partículas sin péptido o modificadas con el péptido de control OVA<sub>323-339</sub> no impidieron la inducción de la enfermedad. Sin embargo, las partículas de PLGA modificadas con PLP<sub>139-151</sub> produjeron un puntaje clínico de 0 (sin enfermedad) excepto puntajes clínicos menores de 1 exhibidos entre los días 20 y 30.

45 La Figura 3 muestra que el tipo de partícula administrada tiene un efecto en el desarrollo de EAE en el modelo de ratón. A) muestra la puntuación clínica media y B) muestra la puntuación acumulada media de los animales EAE. 50 Los ratones se trataron con OVA<sub>323-339</sub>-PLS (N = 5), OVA<sub>323-339</sub>-PLGA<sub>PHOSPOREX</sub> (N = 5), OVA<sub>323-339</sub>-PLGA<sub>PEMA</sub> (N = 5), PLP<sub>139-151</sub>-PLA (N = 5), PLP<sub>139-151</sub>-PLGA<sub>PHOSPOREX</sub> (N = 5), o PLP<sub>139-151</sub>-PLG<sub>PEMA</sub> (N = 5) el día -7 en relación con el momento de la inmunización (día 0). La enfermedad máxima se observó típicamente entre el día 12 y 14, y los ratones se clasificaron para detectar la enfermedad clínica. Las partículas, de cualquier composición, que se modificaron con el péptido de control OVA<sub>323-339</sub> no impidieron la inducción de la enfermedad. Sin embargo, las perlas de acopladas a PLP<sub>139-151</sub> fueron más efectivas en la regulación a la baja de la inducción de R-EAE que PLG comercial acopladas a PLP<sub>139-151</sub> (fosforeas) o poliestireno.

La Figura 4 muestra que los ratones tratados con OVA soluble en el día 28 mostraron una disminución de la temperatura en comparación con los animales tratados con la partícula OVA-PLG. No se observó ninguna disminución de la temperatura corporal en el plazo de 1 hora después de la administración de las partículas.

5 La Figura 5 muestra que la administración de PLP-PLG durante la remisión no produce ninguna mortalidad asociada a la anafilaxia. Se indujo EAE en ratones SJL/J hembra de seis a ocho semanas de edad mediante inyección subcutánea de PLP<sub>139-151</sub> en CFA, y se monitorizó y registró el desarrollo de la enfermedad clínica (B). En el día 21 en relación con la inducción de la enfermedad, a los ratones se les administraron inyecciones iv de PLP<sub>139-151</sub> soluble (cuadrados claros), OVA<sub>323-339</sub> soluble (círculos claros), o los mismos péptidos acoplados a las nanopartículas de PLG (sólidos). La temperatura de los animales se controló y registró cada 10 minutos durante 1 hora después de la inyección (A).

15 La Figura 6 muestra la dosis óptima de PLP<sub>139-151</sub>-PLG administrada por vía intravenosa siete días antes de la inducción de la enfermedad. El desarrollo de la enfermedad clínica se midió en comparación con los ratones SJL/J tratados con OVA<sub>323-339</sub>-PLG (A). Se inyectaron de seis a ocho ratones SJL/J hembra de seis a ocho semanas de edad con cualquiera de las nanopartículas de PLG acopladas con PLP<sub>139-151</sub> (cuadrado) u OVA<sub>323-339</sub> (círculo). La EAE se indujo mediante inyección subcutánea de PLP<sub>139-151</sub> en CFA 7 días (B), 25 días (C) o 50 días (D) después. Los animales del panel B fueron seguidos para analizar la enfermedad clínica durante 100 días. En el día 8 en relación con la inducción de la enfermedad, se llevó a cabo una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) en un subconjunto de los ratones que se muestran en el panel B (E). Los animales representativos seleccionados de los grupos cebados con PLP<sub>139-151</sub>/CFA en el panel B (OVA<sub>323-339</sub>-PLG y PLP<sub>139-151</sub>-PLG) se sometieron a un tratamiento auditivo con el epítipo PLP<sub>139-151</sub> de cebado y el péptido control OVA<sub>323-339</sub>. La hinchazón de la oreja como medida de DTH se determinó 24 h más tarde y se restaron las respuestas antes de la exposición. Se inyectaron por vía intravenosa ratones SJL/J hembra de seis a ocho semanas de edad con nanopartículas de PLG acopladas a PLP<sub>178-191</sub> (triángulo), OVA<sub>323-339</sub> (círculo), o PLP<sub>139-151</sub> (cuadrado), o partículas solas sin acoplar (círculo esbozado) (F). La EAE se indujo 7 días después mediante una inyección subcutánea de PLP<sub>178-191</sub> en CFA, y la enfermedad se monitorizó en los puntos temporales mostrados.

La Figura 7A-D muestra que la tolerancia profiláctica es más eficiente cuando las partículas de PLG-PLP<sub>139-151</sub> se administran por vía intravenosa o intraperitoneal. Los animales tratados con PLP<sub>139-151</sub>-PLG administrados por vía intravenosa no desarrollaron enfermedad y tuvieron puntuaciones clínicas medias de 0 en la mayoría de los puntos temporales.

30 La Figura 8A-F muestra que la administración de partículas de OVA<sub>323-339</sub>-PLG inhibió las respuestas Th1 y Th17 en los animales tratados.

La Figura 9A-C muestra una reducción en la infiltración de células inmunitarias dentro de la médula espinal de los animales tratados con PLP<sub>139-151</sub>-PLG que fue más similar al tejido nativo que al tejido de los animales tratados con OVA<sub>323-339</sub>-PLG. Los animales tratados con OVA<sub>323-339</sub>-PLG tenían tinción positiva para CD45, CD4 y CD11b; mientras que, los animales tratados con PLP<sub>139-151</sub>-PLG tuvieron una tinción mínima para estos factores.

40 La Figura 10A-C muestra que la administración de partículas de PLP<sub>139-151</sub>-PLG inhibe el bloqueo de la barrera hematoencefálica (BBB) y la activación de macrófagos en la médula espinal de ratones tratados. Los animales se trataron con adyuvante completo de Freund (CFA), partículas de PLG OVA<sub>323-339</sub>, o partículas de PLP<sub>139-151</sub>-PLG. Se determinaron los puntajes clínicos y el porcentaje de incidencia de EAE (B) y se observaron las médulas espinales mediante imágenes in vivo (A y C).

La Figura 11 A y B muestra las médulas espinales de ratones tratados mediante imágenes in vivo. C-D son gráficos que muestran la cuantificación de los datos de la imagen.

45 La Figura 12 muestra que la administración de partículas de PLG en las que se ha encapsulado PLP<sub>139-151</sub> inhibe la inducción de R-EAE en ratones. La capacidad de encapsular autoantígenos permite el uso de mezclas complejas de proteínas o incluso de homogeneizados de órganos no posibles con la unión a la superficie, lo que permite una mayor cobertura de antígenos y, por lo tanto, un tratamiento más eficaz de la propagación de epítopos.

La Figura 13 muestra que los animales tratados con las partículas PLP<sub>139-151</sub>-PLG y un anticuerpo anti-CD25 demostraron, a veces, una puntuación clínica media mayor que los animales tratados con partículas PLP<sub>139-151</sub>-PLG y un anticuerpo IgG de control.

50 La Figura 14 muestra la tolerancia terapéutica inducida por las partículas PLP<sub>139-151</sub>-PLG en EAE activa y adoptiva. Se indujo EAE adoptiva en ratones hembra SJL/J de seis a ocho semanas de edad mediante transferencia adoptiva de  $2,5 \times 10^6$  blastos activados con PLP<sub>139-151</sub>. A los ratones se les inyectó iv con péptido PLP<sub>139-151</sub> (cuadrados) u OVA<sub>323-339</sub> (círculos) acoplado a nanopartículas de PLG de 500 nm 2 días (A) o 14 días (C) después de la inducción de la enfermedad. Las puntuaciones de la enfermedad clínica se compararon con las que siguieron al tratamiento con esplenocitos acoplados a antígeno (A). El cerebro y la médula espinal se recolectaron de ratones tolerados con PLP<sub>139-151</sub> - o OVA<sub>323-339</sub> para el análisis histológico en el día 42. Las secciones de ratones del panel A se tiñeron para la proteína PLP y CD45 (B). Las secciones de médula espinal de ratones del panel (C) se tiñeron con Luxol Fast Blue (D). Las áreas de desmielinización e infiltración celular están indicadas por flechas.

- 5 La Figura 15 muestra gráficas que muestran las puntuaciones clínicas medias de ratones con EAE activa y EAE adoptiva después del tratamiento con partículas SP o PLG conjugadas con OVA<sub>323-339</sub> o PLP<sub>139-151</sub>. Los ratones fueron inyectados iv con péptido PLP<sub>139-151</sub>-SP, PLP<sub>139-151</sub>-PLG, u OVA<sub>323-339</sub>-SP, u OVA<sub>323-339</sub>-PLG acoplado a nanopartículas de 500 nm 10 días (A) o 2 días (B) después de la inducción de la enfermedad y se determinó la puntuación clínica media. En ambos casos, la administración de partículas PLP<sub>139-151</sub>-PLG induce tolerancia en los ratones.
- 10 La Figura 16 muestra que la infiltración de células inmunitarias del sistema nervioso central también se reduce drásticamente en ratones tolerados con PLP-PLG. Se inyectaron ratones SJL/J i.v. con nanopartículas de PLG de 500 nm acopladas con PLP<sub>139-151</sub> (cuadrados) u OVA<sub>323-339</sub> (círculos) 2 días después de la inducción de EAE por transferencia adoptiva. En el punto máximo de la enfermedad (día 14), se extrajeron los cerebros y la médula espinal y se contó por citometría de flujo el número de linfocitos (B), APC (C), microglía (D), células dendríticas periféricas (E), células dendríticas mieloides (F) y macrófagos (G). La estrategia de activación de estas poblaciones se describe en (A). Las preparaciones con células CNS se estimularon con PMA e ionomicina durante 5 h antes de la tinción intracelular para IL-17A e IFN-γ (H).
- 15 La Figura 17 muestra que la administración del péptido PLP<sub>139-151</sub> encapsulado en una partícula PLG induce tolerancia cuando la partícula se administra con PBS. Sin embargo, la administración del anticuerpo anti-PD-1 disminuye esta tolerancia.
- 20 La Figura 18 muestra que la administración del péptido PLP<sub>139-151</sub> encapsulado en una partícula PLG induce tolerancia cuando la partícula se administra con PBS. La administración de un anticuerpo anti-CD40 disminuye esta tolerancia, pero esta disminución en la tolerancia se revierte mediante la adición de un anticuerpo anti-IL-12.
- La Figura 19A-G muestra que la administración profiláctica de OVA-PLG disminuyó la secreción de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, y redujo los niveles de IgE de OVA en suero y eosinófilos en el pulmón.
- 25 La Figura 20 muestra que la OVA encapsulada en partículas de PLG inhibe profilácticamente las respuestas de recuerdo in vitro específicas de OVA de los ganglios linfáticos mediastínicos. La proliferación de ganglios linfáticos observada después de la re-estimulación con 25 µg de OVA disminuye en los animales tratados con OVA-PLG (A). Además, el tratamiento con OVA-PLG disminuye la liberación de citoquinas después de la reestimulación con OVA. Los niveles de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 disminuyen en ratones tratados con OVA-PLG (B).
- La Figura 21 muestra que la administración terapéutica de OVA-PLG disminuyó la secreción de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, y redujo los niveles de IgE de OVA en suero y de eosinófilos en el pulmón.
- 30 La Figura 22 muestra que la OVA encapsulada en partículas de PLG regula a la baja terapéuticamente las citocinas Th2 específicas de OVA en el fluido BAL mejor que las partículas de PLG acopladas a OVA. Los ratones se trataron por vía intraperitoneal con OVA/alumbre a una dosis de 10 µg/ratón en el día 0 y el día 14. Los ratones se administraron por vía intravenosa con partículas de PLG acopladas a OVA u OVA encapsulado en partículas de PLG en los días 28 y 42. Entre los días 56 y 58, los ratones se trataron tres veces con OVA en aerosol. Los gráficos representan la secreción de citoquinas cuando los animales se trataron con OVA acoplado a partículas de PLG (A) o con OVA encapsulado dentro de partículas de PLG (B).
- 35 La Figura 23 muestra los niveles de glucosa en sangre de animales diabéticos tipo 1 después del tratamiento con partículas p31-PLG. La administración de las partículas PLG acopladas al péptido p31 dio como resultado niveles de glucosa en sangre más bajos en comparación con los observados después de la administración con las partículas acopladas al péptido MOG<sub>35-55</sub> (A y B). El porcentaje de células secretoras de IFNγ observadas en los animales también se redujo en los ratones tratados con p31-PLG en comparación con los ratones tratados con péptido MOG<sub>35-55</sub>-PLG (C).
- 40 La Figura 24A-B muestra que la tolerancia inducida por p31-PLG requiere Tregs. La diabetes tipo 1 fue inducida en ratones por transferencia adoptiva. Dos horas después de que las células activadas se transfirieran a los ratones NOD.SCID, los ratones se toleraron con partículas p31-PLG o MOG<sub>35-55</sub> PLG. El agotamiento de los Tregs abroga la tolerancia inducida por la administración de partículas p31-PLG.
- 45 La Figura 25 muestra que la administración de partículas de PLG acopladas a insulina aumentaba significativamente el porcentaje de ratones que no desarrollaban diabetes durante 300 días (69,6% comparado con 22,7%; p = 0,0027). Los ratones NOD se trataron con partículas de PLG acopladas con BSA (N = 22) o con insulina (N = 23) mediante administración intravenosa a las 6, 8 y 10 semanas de edad. Los ratones fueron sometidos a ensayos para determinar el desarrollo de la diabetes.
- 50 La Figura 26 muestra el porcentaje de células donantes CD45.1 observadas en los ratones receptores. Los ratones hembra CD45.2 fueron tolerados con OVA-PLG o Dby-PLG en el día 7. El día 1, los ratones fueron sometidos a irradiación con 200 rads y luego fueron sometidos al trasplante de 1x10<sup>6</sup>, 5x10<sup>6</sup> o 1x10<sup>7</sup> células de médula ósea de ratones macho CD45.1 el día 0. A los ratones receptores se les indujo tolerancia luego con OVA-PLG, Dby-SP o Dby-PLG el día 1 y la sangre se extrajo para el análisis FACS del quimerismo.
- 55

- La Figura 27 muestra el porcentaje de células CD45.1 donadoras en los ratones receptores después de la inducción de tolerancia con OVA-PLG, Dby-SP o Dby-PLG el día 1. Un ratón de control positivo no mostró injerto significativo (~10%). Ningún ratón de control negativo injertó células donantes. Un ratón Dby-SP no mostró injerto significativo (~10%). Dos ratones OVA-PLG injertaron células donadoras (~10%): una completamente rechazada en la semana 16. Un ratón Dby-PLG comenzó a rechazarse en la semana 12 y estaba en el 10% en la semana 16. El grupo Dby-PLG varió entre un 10% y un 56% de injerto en la semana 16. Los ratones OVA-PLG mostraron: 1) injerto espontáneo, 2) homología de secuencia entre OVA323 y Dby, o 3) propiedades tolerogénicas de las partículas. Dby-PLG permite más injertos que Dby-SP y OVA-PLG.
- La Figura 28 muestra que la tolerancia del tiempo tiene cierto efecto en el porcentaje de células CD45.1 en el ratón receptor. Los controles positivos muestran menos injertos (~4%) de lo esperado (~10%). Un ratón con control negativo tenía un 5% de injerto de todos los 3 grupos OVA-PLG, un ratón en el grupo Día -7, Día +1 mostró un cierto injerto (12%). La tolerancia en el día 1 es más relevante clínicamente que la tolerancia en el día -7.
- La Figura 29 muestra que las partículas de cumarina-6 PLGA, que estaban acopladas a un antígeno o que no tenían antígeno, fueron detectables a las 3 horas posteriores a la administración, pero no a las 24 horas posteriores a la administración. Las partículas fueron detectables a las 3 horas posteriores a la administración, pero no a las 24 horas posteriores a la administración. Ratón naïve no inyectado (fila superior) en comparación con secciones i.v. de micropartículas fluorescentes de PLGA/PEMA con inyección de bazo de ratón (columna izquierda), hígado (columna central) y pulmón (columna izquierda) a las 3 horas posteriores a la inyección (fila central) y a las 24 horas (fila inferior) posteriores a la inyección, contrastada con DAPI.
- La Figura 30 muestra que las partículas de PLGA se localizan conjuntamente después de 6 y 15 horas con células F4/80<sup>+</sup> en el hígado.
- La Figura 31 muestra que los macrófagos de la zona marginal predominante absorben las partículas acopladas con PLP<sub>139-151</sub> marcadas con TAMRA 24 horas después de la infusión intravenosa. El mayor porcentaje de células PLP<sub>139-151</sub> son macrófagos de la zona marginal.
- La Figura 32 muestra la puntuación clínica media diaria frente al número de días de preparación de PLP<sub>139-151</sub>/CFA. La R-EAE inducida por PLP<sub>139-151</sub>/CFA se inhibe en ratones SJL/J mediante la inducción de tolerancia inmunológica utilizando partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen PLP139-151 soluble dentro de sus núcleos.
- La Figura 33 muestra que los ratones tratados con OVA-PLG encapsulado mostraron la mayor reducción en la acumulación de eosinófilos.
- La Figura 34 muestra que los ratones tratados con OVA-PLG encapsulado mostraron la mayor reducción en los niveles séricos de IgE en comparación con los animales no tratados o tratados con control.
- La Figura 35 muestra la caracterización de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen PLP<sub>139-151</sub> soluble dentro de sus núcleos mediante un análisis dinámico de dispersión de la luz. Las partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) a una tasa de conteo de  $1,792 \times 10^5$  conteos por segundo en 18,2 MΩ de agua. La población de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie tenía un diámetro Z promedio de 584 nm, un diámetro máximo de 679 nm y un índice de polidispersidad de 0,162. Estos resultados son representativos de 6 lotes de síntesis, siguiendo el protocolo escrito anteriormente.
- La Figura 36 muestra la caracterización de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen PLP139-151 soluble dentro de sus núcleos mediante una medición del potencial ζ. Las partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) a una tasa de conteo de  $6,67 \times 10^4$  conteos por segundo en 18,2 MΩ de agua. La población de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie tenía un potencial ζ máximo de -48,9 mV y una desviación de ζ de 5,14 mV. Estos resultados son representativos de 6 lotes de síntesis, siguiendo el protocolo escrito anteriormente.
- La Figura 37 muestra la caracterización de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen ovoalbúmina soluble dentro de sus núcleos mediante análisis de dispersión dinámica de la luz. Las partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) a una tasa de recuento de  $1,822 \times 10^5$  conteos por segundo en 18,2 MΩ de agua. La población de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie tenía un diámetro promedio de Z de 569,7 nm, un diámetro máximo de 700,3 nm y un índice de polidispersidad de 0,230. Estos resultados son representativos de 3 lotes de síntesis, siguiendo el protocolo escrito anteriormente.
- La Figura 38 muestra la caracterización de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen ovoalbúmina soluble dentro de sus núcleos mediante la medición del potencial ζ. Las partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) a una tasa de conteo de  $2,67 \times 10^4$  conteos por segundo en 18,2 MΩ de agua. La

población de partículas de poli(lactida co-glicólido) funcionalizadas en la superficie tenía un potencial  $\zeta$  máximo de -52,2 mV y una desviación de  $\zeta$  de 5,38 mV. Estos resultados son representativos de 3 lotes de síntesis, siguiendo el protocolo escrito anteriormente.

5 La Figura 39 muestra una gráfica que demuestra que los liposomas funcionalizados en la superficie que contienen péptido PLP<sub>139-151</sub> soluble dentro de sus núcleos inducen tolerancia inmunológica en el modelo murino de la esclerosis múltiple. Los animales se trataron con liposomas funcionalizados en la superficie que contenían péptidos PLP<sub>139-151</sub> solubles dentro de sus núcleos (círculos) o con liposomas funcionalizados en la superficie que contenían el péptido OVA<sub>323-339</sub> soluble (cuadrados). Las puntuaciones clínicas medias de los animales que recibieron los liposomas peptídicos PLP<sub>139-151</sub> fueron inferiores a las de los animales que recibieron los liposomas peptídicos  
10 OVA<sub>323-339</sub>.

### Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han encontrado que las nanopartículas acopladas al antígeno pueden inducir tolerancia a la enfermedad autoinmune y disminuir la respuesta inmune. Estas partículas pueden inducir tolerancia independientemente de si están unidas a la superficie de la partícula o encapsuladas en su interior. Estas partículas,  
15 por lo tanto, pueden ser útiles en el tratamiento de cualquier enfermedad o afección caracterizada por una respuesta inmune inflamatoria excesiva, como las enfermedades autoinmunes.

"Partícula", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier composición de materia no derivada de tejido, puede ser una esfera o entidad similar a una esfera, perla o liposoma. El término "partícula", la expresión "partícula modificadora inmune", la expresión "partícula vehículo" y el término "perla" se pueden usar indistintamente  
20 dependiendo del contexto. Además, el término "partícula" se puede usar para abarcar perlas y esferas.

"Partícula cargada negativamente", como se usa en este documento, se refiere a partículas que han sido modificadas para poseer una carga superficial neta que sea menor que cero.

Las "partículas carboxiladas" o las "perlas carboxiladas" o las "esferas carboxiladas" incluyen cualquier partícula que haya sido modificada para contener un grupo carboxilo en su superficie. En algunas realizaciones, la adición del  
25 grupo carboxilo mejora la captación de fagocitos/monocitos de las partículas en la circulación, por ejemplo, a través de la interacción con los receptores secuestrantes, tales como MARCO. La carboxilación de las partículas se puede lograr utilizando cualquier compuesto que agregue grupos carboxilo, incluidos, entre otros, Poli(etileno-anhídrido maleico) (PEMA).

El "resto antigénico", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier resto, por ejemplo un péptido,  
30 que es reconocido por el sistema inmunitario del huésped. Los ejemplos de restos antigénicos incluyen, entre otros, autoantígenos y/o proteínas, péptidos o componentes bacterianos o virales. Sin pretender imponer ninguna teoría, mientras que las propias perlas carboxiladas pueden ser reconocidas por el sistema inmune, las perlas carboxiladas sin nada más unido a éstas no se consideran "restos antigénicos" para los fines de la invención.

"Perlas desnudas" o "partículas desnudas" o "esferas desnudas" como se usa en el presente documento se refiere a perlas, partículas o esferas que no se han carboxilado.  
35

"Mediadores proinflamatorios" o "polipéptidos proinflamatorios", como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos o fragmentos de los mismos que inducen, mantienen o prolongan la inflamación en un sujeto. Los ejemplos de mediadores proinflamatorios incluyen, entre otros, citoquinas y quimiocinas.

La partícula puede tener cualquier forma de partícula o conformación. Sin embargo, en algunas realizaciones se prefiere usar partículas que tengan menos probabilidades de acumularse in vivo. Ejemplos de partículas dentro de estas realizaciones son aquellas que tienen una forma esférica.  
40

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende una partícula modificada inmune que tiene un potencial zeta negativo y que está libre de restos antigénicos. En una realización adicional, la descripción proporciona composiciones que comprenden una partícula modificada inmune con un potencial zeta negativo  
45 acoplado a un antígeno. En una realización adicional, el antígeno se acopla al exterior de la partícula. En otra realización adicional de la invención, el antígeno está encapsulado dentro de la partícula.

Otro aspecto más de la descripción se refiere a un procedimiento para la preparación de una partícula inmune modificada con un potencial zeta negativo y libre de restos antigénicos. El procedimiento implica poner en contacto un precursor inmune de partículas modificadas con una solución tampón en condiciones efectivas para formar la  
50 partícula inmune modificada con un potencial zeta negativo. En algunas realizaciones de esta descripción, el precursor de partículas inmune modificado está formado por copolimerización. La microestructura de partículas puede depender del método de copolimerización.

En algunas realizaciones, la molécula peptídica antigénica se acopla a la partícula vehículo (por ejemplo, una partícula modificada inmune) mediante una molécula conjugada y/o un grupo enlazador. En algunas realizaciones, el  
55 acoplamiento del péptido antigénico y/o la molécula de señalización apoptótica al vehículo (por ejemplo, partícula de

PLG) comprende una o más interacciones covalentes y/o no covalentes. En algunas realizaciones, el péptido antigénico está unido a la superficie de la partícula vehículo con un potencial zeta negativo. En algunas realizaciones, el péptido antigénico está encapsulado dentro de la partícula vehículo con un potencial zeta negativo.

5 En una realización, la solución tampón que entra en contacto con la partícula modificada inmune puede tener un pH básico. El pH básico adecuado para la solución básica incluye 7,1, 7,5, 8,0, 8,5, 9,5, 10,0 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0 y 13,5. La solución tampón también puede estar hecha de cualquier base adecuada y su conjugado. En algunas realizaciones de la invención, la solución tampón puede incluir, sin limitación, bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio, bicarbonato de litio, dihidrógeno fosfato de potasio, dihidrógeno fosfato de sodio o dihidrógeno fosfato de litio y conjugados de los mismos.

10 En una realización, las partículas modificadas inmunes contienen copolímeros. Estos copolímeros pueden tener una relación molar variable. La proporción adecuada de copolímero de las presentes partículas inmunes modificadas puede ser 80:20, 81:19, 82:18, 83:17, 84:16, 85:15, 86:14, 87:13, 88:12, 89:11, 90:10, 91:9, 92:8, 93:7, 94:6, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2, 99:1, o 100:0. En otra realización, el copolímero puede ser un copolímero periódico, estadístico, lineal, ramificado (incluidos los copolímeros en forma de estrella, brocha o peine). En algunas realizaciones, la  
15 relación de copolímeros puede ser, entre otras, poliestireno:poli(carboxilato de vinilo)/80:20, poliestireno:poli(carboxilato de vinilo)/90:10, poli(carboxilato de vinilo):poliestireno/80:20, poli(carboxilato de vinilo):poliestireno/90:10, ácido poliláctico: ácido poliglicólico/80:20, o ácido poliláctico:ácido poliglicólico/90:10.

20 En una realización, la partícula es un liposoma. En una realización adicional, la partícula es un liposoma compuesto de los siguientes lípidos en las siguientes relaciones molares: 30:30:40 fosfatidilcolina:fosfatidilglicerol:colesterol. En otra realización más, la partícula se encapsula dentro de un liposoma.

No es necesario que cada partícula tenga un tamaño uniforme, aunque las partículas generalmente deben tener un tamaño suficiente para desencadenar la fagocitosis en una célula presentadora de antígeno u otra célula MPS. Preferiblemente, las partículas son de tamaño microscópico o nanoscópico, para mejorar la solubilidad, evitar posibles complicaciones causadas por la agregación in vivo y facilitar la pinocitosis. El tamaño de las partículas  
25 puede ser un factor para la captación desde el espacio intersticial hacia áreas de maduración de linfocitos. Una partícula con un diámetro de aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  es capaz de desencadenar la fagocitosis. Así, en una realización, la partícula tiene un diámetro dentro de estos límites. En otra realización, la partícula tiene un diámetro de aproximadamente 0,3  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . En otra realización más, la partícula tiene un diámetro de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ . En una realización más, la  
30 partícula tiene un tamaño de aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 0,2  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 0,3  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 0,4  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 1,5  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 2,0  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 2,5  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 3,0  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 3,5  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 4,0  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 4,5  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 5,0  $\mu\text{m}$ . En una realización particular, la partícula tiene un tamaño de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, los pesos totales de las partículas son menores que aproximadamente 10.000 kDa, menores que aproximadamente 5.000 kDa, o menores que aproximadamente 1.000 kDa, 500 kDa, 400 kDa, 300 kDa, 200 kDa, 100 kDa, 50 kDa, 20 kDa, 10 kDa. Las partículas en una composición no tienen que poseer un diámetro uniforme. A modo de ejemplo, una formulación farmacéutica puede contener una pluralidad de partículas, algunas de las cuales tienen un tamaño de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$ , mientras que otras tienen un tamaño de aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$ . Cualquier mezcla de  
40 tamaños de partícula dentro de estos intervalos dados será útil.

Las partículas de la presente descripción pueden poseer un potencial zeta particular. En ciertas realizaciones, el potencial zeta es negativo. En una realización, el potencial zeta es menor que aproximadamente -100 mV. En una realización, el potencial zeta es menor que aproximadamente -50 mV. En ciertas realizaciones, las partículas poseen un potencial zeta entre -100 mV y 0 mV. En una realización más, las partículas poseen un potencial zeta entre -75  
45 mV y 0 mV. En una realización más, las partículas poseen un potencial zeta entre -60 mV y 0 mV. En una realización más, las partículas poseen un potencial zeta entre -50 mV y 0 mV. En otra realización más, las partículas poseen un potencial zeta entre -40 mV y 0 mV. En una realización más, las partículas poseen un potencial zeta entre -30 mV y 0 mV. En una realización más, las partículas poseen un potencial zeta entre -20 mV y +0 mV. En una realización más, las partículas poseen un potencial zeta entre -10 mV y -0 mV. En una realización particular, las partículas poseen un potencial zeta entre -50 mV y -40mV.  
50

En algunas realizaciones, la carga de un vehículo (por ejemplo, positivo, negativo, neutro) se selecciona para impartir beneficios específicos de la aplicación (por ejemplo, compatibilidad fisiológica, interacciones beneficiosas de la superficie con el péptido, etc.). En algunas realizaciones, un vehículo tiene una carga neutra o negativa neta (por ejemplo, para reducir la unión no específica a las superficies celulares que, en general, tienen una carga negativa neta). En ciertas realizaciones, los vehículos pueden conjugarse, directa o indirectamente, con un antígeno al que se desea tolerancia (también denominado en este documento péptido específico de antígeno, péptido antigénico, autoantígeno, antígeno inductor o antígeno tolerante). En algunos casos, un vehículo tiene múltiples sitios de unión (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10... 20... 50... 100, o más) para tener múltiples copias de un péptido específico de antígeno, o múltiples péptidos diferentes, expuestos en la superficie (por ejemplo, para aumentar la probabilidad de una respuesta de tolerancia). En algunas realizaciones, un vehículo muestra un único tipo de péptido antigénico. En algunas realizaciones, un vehículo muestra múltiples péptidos antigénicos diferentes en la superficie. En algunas  
55  
60

realizaciones, una superficie vehículo muestra grupos funcionales para la unión covalente de restos seleccionados (por ejemplo, péptidos antigénicos). En algunas realizaciones, los grupos funcionales de la superficie del vehículo proporcionan sitios para la interacción no covalente con restos seleccionados (por ejemplo, péptidos antigénicos). En algunas realizaciones, un vehículo tiene una superficie a la que pueden adsorberse restos de conjugación sin formación de enlaces químicos.

En algunas realizaciones, la partícula es no metálica. En estas realizaciones, la partícula se puede formar a partir de un polímero. En una realización preferida, la partícula es biodegradable en un individuo. En esta realización, las partículas pueden proporcionarse en un individuo a través de múltiples dosis sin que haya ninguna acumulación de partículas en el individuo. Los ejemplos de partículas adecuadas incluyen partículas de poliestireno, partículas de PLGA y partículas con forma de diamante.

Preferiblemente, la superficie de la partícula está compuesta de un material que minimiza las interacciones biológicas no específicas o no deseadas. Las interacciones entre la superficie de la partícula y el intersticio pueden ser un factor que juega un papel en la captación linfática. La superficie de la partícula puede ser recubierta con un material para prevenir o disminuir las interacciones no específicas. La estabilización estérica mediante el recubrimiento de partículas con capas hidrófilas como con el poli(etilenglicol) (PEG) y sus copolímeros, tales como PLURONICS (incluidos los copolímeros de poli(etilenglicol)-bl-poli(propilenglicol)-bl-poli(etilenglicol)) pueden reducir las interacciones inespecíficas con proteínas del intersticio, como lo demuestra la captación linfática mejorada después de inyecciones subcutáneas. Todos estos hechos apuntan a la importancia de las propiedades físicas de las partículas en términos de captación linfática. Los polímeros biodegradables se pueden usar para hacer todos o algunos de los polímeros y/o partículas y/o capas. Los polímeros biodegradables pueden sufrir degradación, por ejemplo, por el resultado de grupos funcionales que reaccionan con el agua en la solución. El término "degradación", como se usa en el presente documento, se refiere a volverse soluble, ya sea por reducción del peso molecular o por conversión de grupos hidrófobos en grupos hidrófilos. Los polímeros con grupos éster están generalmente sujetos a hidrólisis espontánea, por ejemplo, polilactidas y poliglicólidos.

Las partículas también pueden contener componentes adicionales. Por ejemplo, los vehículos pueden tener agentes formadores de imágenes incorporados o conjugados con el vehículo. Un ejemplo de una nanoesfera vehículo que tiene un agente de imagen que actualmente está disponible comercialmente son las nanoesferas X-sight de Kodak. Los nanocristales luminiscentes de confinamiento cuántico inorgánicos, conocidos como puntos cuánticos (QD), se han convertido en donantes ideales en aplicaciones FRET: su alto rendimiento cuántico y los cambios de Stokes dependientes del tamaño ajustables permiten que diferentes tamaños emitan del azul al infrarrojo cuando se activan con una longitud de onda ultravioleta única. (Bruchez, et al., *Science*, 1998, 281, 2013; Niemeyer, C. M *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 5796; Wagoner, A. *Métodos Enzymol.* 1995, 246, 362; Brus, L. E. J. *Chem. Fis.* 1993, 79, 5566). Los puntos cuánticos, como los puntos cuánticos híbridos orgánicos/inorgánicos basados en una clase de polímeros conocidos como dendrímeros, se pueden usar en los sistemas de marcaje biológico, imágenes y biosensores ópticos. (Lemón, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 12886). A diferencia de la síntesis tradicional de puntos cuánticos inorgánicos, la síntesis de estas nanopartículas de puntos cuánticos híbridos no requiere altas temperaturas o reactivos inestables altamente tóxicos. (Etienne, et al., *Appl. Phys. Lett.* 87, 181913, 2005).

Las partículas pueden formarse a partir de una amplia gama de materiales. Las partículas están compuestas preferiblemente de un material adecuado para el uso biológico. Por ejemplo, las partículas pueden estar compuestas de vidrio, sílice, poliésteres de ácidos hidroxicarboxílicos, polianhídridos de ácidos dicarboxílicos o copolímeros de ácidos hidroxicarboxílicos y ácidos dicarboxílicos. Más generalmente, las partículas vehículos pueden estar compuestas de poliésteres de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, saturados o insaturados, lineales o reticulados, alcanilo, haloalquilo, tioalquilo, aminoalquilo, arilo, aralquilo, alquenilo, aralquenilo, heteroarilo o alcoxi hidroxilácidos, o polianhídridos de cadena lineal o ramificada, alcanilo, haloalquilo, tioalquilo, aminoalquilo, arilo, aralquilo, alquenilo, aralquenilo, heteroarilo o alcóxialcarboxílicos sustituidos o no sustituidos, saturados o insaturados, lineales o reticulados. Además, las partículas vehículos pueden ser puntos cuánticos o estar compuestas de puntos cuánticos, como las partículas de poliestireno de puntos cuánticos (Joumaa et al. (2006) *Langmuir* 22: 1810-6). También pueden emplearse partículas vehículos que incluyen mezclas de enlaces éster y anhídrido (por ejemplo, copolímeros de ácido glicólico y sebácico). Por ejemplo, las partículas vehículos pueden comprender materiales que incluyen polímeros de ácido poliglicólico (PGA), polímeros de ácido poliláctico (PLA), polímeros de ácido polisebácico (PSA), copolímeros de ácido poli(láctico-co glicólico) (PLGA o PLG; los términos son intercambiables), copolímeros de ácido[ $\rho$ ]poli(láctico-co-sebácico) (PLSA), copolímeros de ácido poli(glicólico-co-sebácico) (PGSA), etc. Otros polímeros biocompatibles y biodegradables útiles en la presente descripción incluyen polímeros o copolímeros de caprolactonas, carbonatos, amidas, aminoácidos, ortoésteres, acetales, cianoacrilatos y uretanos degradables, así como copolímeros de estos con cadena lineal o ramificada, sustituida o no sustituida, alcanilo, haloalquilo, tioalquilo, aminoalquilo, alquenilo o ácidos hidroxil o dicarboxílicos aromáticos. Además, los aminoácidos biológicamente importantes con grupos de cadena lateral reactiva, como lisina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, tirosina y cisteína, o sus enantiómeros, pueden incluirse en copolímeros con cualquiera de los materiales mencionados anteriormente para proporcionar grupos reactivos para conjugar péptidos y proteínas antigénicos o restos de conjugación. Los materiales biodegradables adecuados para la presente descripción incluyen polímeros de diamante, PLA, PGA y PLGA, siendo los polímeros PLGA adecuados para su uso en la invención. También se pueden usar materiales biocompatibles pero no biodegradables en las partículas vehículos de la descripción. Por ejemplo, se pueden emplear polímeros no biodegradables de acrilatos,

acetatos de etilen-vinilo, acetatos de celulosa sustituidos con acilo, uretanos no degradables, estirenos, cloruros de vinilo, fluoruros de vinilo, vinil imidazoles, olefinas clorosulfonadas, óxido de etileno, alcoholes vinílicos, TEFLON® (DuPont, Wilmington, Del.) y nylons.

5 Las perlas adecuadas, que están actualmente disponibles comercialmente, incluyen perlas de poliestireno tales como FluoSpheres (Molecular Probes, Eugene, Oreg.).

10 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona sistemas que comprenden: (a) una estructura de suministro configurada para la administración de agentes químicos y/o biológicos a un sujeto; y (b) partículas de poli(lactida-co-glicólido) acopladas a antígeno para la inducción de tolerancia específica de antígeno. En algunas realizaciones, al menos una parte de dicha estructura de administración es microporosa. En algunas realizaciones, las partículas de poli(lactida-co-glicólido) acopladas con antígeno se encapsulan dentro de dicha estructura. En algunas realizaciones, los agentes químicos y/o biológicos se seleccionan del grupo que consiste en: proteína, péptido, moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, células y partículas. En algunas realizaciones, los agentes químicos y/o biológicos comprenden células, y dichas células comprenden células de islotes pancreáticos.

15 Las propiedades físicas también están relacionadas con la utilidad de las nanopartículas después de la captación y retención en áreas que tienen linfocitos inmaduros. Éstas incluyen propiedades mecánicas tales como la rigidez o las propiedades de encauchado. Algunas realizaciones se basan en un núcleo de goma, por ejemplo, un núcleo de poli(sulfuro de propileno) (PPS) con una capa superior, por ejemplo, una capa superior hidrófila, como en PEG, como en el sistema PPS-PEG recientemente desarrollado y caracterizado por la administración sistémica (pero no dirigida o inmune). El núcleo de goma contrasta con un núcleo sustancialmente rígido como en un sistema de poliestireno o nanopartículas metálicas. El término gomoso se refiere a ciertos materiales elásticos además de los cauchos naturales o sintéticos, siendo el gomoso un término familiar para aquellos en las técnicas de polímeros. Por ejemplo, el PPS reticulado se puede usar para formar un núcleo de goma hidrófobo. El PPS es un polímero que se degrada en condiciones oxidativas a polisulfóxido y finalmente a polisulfona, pasando de un caucho hidrófobo a un polímero hidrófilo soluble en agua. Otros polímeros de sulfuro pueden adaptarse para su uso, con el término polímero de sulfuro que se refiere a un polímero con un azufre en el esqueleto de la estructura. Otros polímeros gomosos que se pueden usar son poliésteres con una temperatura de transición vítrea en condiciones hidratadas inferior a aproximadamente 37°C. Un núcleo hidrofóbico se puede usar ventajosamente con un recubrimiento hidrofílico desde el núcleo y el recubrimiento tenderá a no mezclarse, por lo que la capa superior tiende a expandirse estéricamente lejos del núcleo. Núcleo se refiere a una partícula que tiene una capa sobre ella. Una capa se refiere a un material que cubre al menos una parte del núcleo. Una capa puede estar adsorbida o unida covalentemente. La partícula o núcleo puede ser sólido o hueco. Los núcleos hidrófobos de caucho son ventajosos respecto a los núcleos hidrófobos rígidos, tales como núcleos cristalinos o vítreos (como en el caso del poliestireno), ya que las partículas pueden transportar cargas más altas de fármacos hidrófobos con los núcleos de caucho hidrófobos.

25 Otra propiedad física es la hidrofiliidad de la superficie. Un material hidrófilo puede tener una solubilidad en agua de al menos 1 gramo por litro cuando no está reticulado. La estabilización estérica de partículas con polímeros hidrófilos puede mejorar la absorción del intersticio al reducir las interacciones no específicas; sin embargo, la mayor naturaleza encubierta de las partículas también puede reducir la internalización de las células fagocíticas en áreas que tienen linfocitos inmaduros. Sin embargo, el desafío de equilibrar estas características competitivas se ha cumplido, y esta solicitud documenta la creación de nanopartículas para el suministro linfático efectivo a las CD y otras APC en los ganglios linfáticos. Algunas realizaciones incluyen un componente hidrófilo, por ejemplo, una capa de material hidrófilo. Ejemplos de materiales hidrófilos adecuados son uno o más de óxidos de polialquileño, óxidos de polietileno, polisacáridos, ácidos poliacrílicos y poliéteres. El peso molecular de los polímeros en una capa se puede ajustar para proporcionar un grado útil de impedimento estérico in vivo, por ejemplo, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 100.000 o incluso más; los expertos apreciarán de inmediato que se contemplan todos los intervalos y valores dentro de los intervalos explícitamente establecidos, por ejemplo, entre 10.000 y 50.000.

30 Las nanopartículas pueden incorporar grupos funcionales para una reacción adicional. Los grupos funcionales para la reacción adicional incluyen electrófilos o nucleófilos; estos son convenientes para reaccionar con otras moléculas. Ejemplos de nucleófilos son las aminas primarias, los tioles y los hidroxilos. Ejemplos de electrófilos son ésteres de succinimidilo, aldehídos, isocianatos y maleimidias.

35 Se puede usar una gran variedad de medios, muy conocidos en la técnica, para conjugar péptidos antigénicos y proteínas a vehículos. Estos métodos incluyen cualquier química estándar que no destruya o limite severamente la actividad biológica de los péptidos y proteínas del antígeno, y que permita conjugar un número suficiente de péptidos y proteínas antigénicas al vehículo en una orientación que permita la interacción del péptido o proteína antigénico con un receptor de células T cognado. En general, se prefieren los métodos que conjugan las regiones C-terminales de un péptido o proteína antigénica, o las regiones C-terminales de un péptido antigénico o proteína de fusión proteica, para el ganador. Las químicas exactas dependerán, por supuesto, de la naturaleza del material ganador, la presencia o ausencia de fusiones C-terminales al péptido o proteína antigénico, y/o la presencia o ausencia de restos de conjugación.

40 Los grupos funcionales se pueden ubicar en la partícula según sea necesario para su disponibilidad. Una ubicación puede ser como grupos laterales o extremos en el polímero central o polímeros que son capas en un núcleo o

polímeros atados a la partícula. Por ejemplo, se incluyen ejemplos en el presente documento que describen el PEG que estabiliza las nanopartículas que pueden funcionalizarse fácilmente para la orientación celular específica o la administración de fármacos de proteínas y péptidos.

5 Los conjugados tales como etilen carbodiimida (ECDI), hexameten diisocianato, propilenglicol di-glicidiléter que contienen 2 residuos epoxi, y epiclorohidrina se pueden usar para la fijación de péptidos o proteínas a la superficie del vehículo. Sin pretender imponer ninguna teoría, se sospecha que el ECDI desempeña dos funciones principales para la inducción de la tolerancia: (a) acopla químicamente las proteínas/péptidos a la superficie celular mediante la catálisis de la formación de enlaces peptídicos entre los grupos amino libre y carboxilo libre; y (b) induce al vehículo a imitar la muerte celular apoptótica de modo que sean recogidos por las células presentadoras de antígeno huésped en el bazo e induzcan tolerancia. Es esta presentación para hospedar células T de una manera no inmunogénica que conduce a la inducción directa de anergia en células autorreactivas. Además, ECDI sirve como un potente estímulo para la inducción de células T reguladoras específicas.

15 En una serie de realizaciones, los péptidos y proteínas antigénicos se unen al vehículo a través de un enlace químico covalente. Por ejemplo, un grupo o resto reactivo cerca del extremo C del antígeno (por ejemplo, el grupo carboxilo C-terminal, o un grupo hidroxilo, tiol o amina de una cadena lateral de aminoácido) puede conjugarse directamente con un grupo reactivo o resto en la superficie del vehículo (por ejemplo, un grupo hidroxilo o carboxilo de un polímero PLA o PGA, un grupo terminal amino o carboxilo de un dendrímero, o un grupo hidroxilo, carboxilo o fosfato de un fosfolípido) por reacción química directa. Alternativamente, puede haber un resto conjugado que conjuga covalentemente tanto a los péptidos y proteínas antigénicos como al vehículo, uniéndolos así entre sí.

20 Los grupos carboxilo reactivos en la superficie de un vehículo pueden unirse a aminas libres (por ejemplo, de residuos de Lys) en el péptido o proteína antigénicos, haciéndolos reaccionar con, por ejemplo, clorhidrato de 1-etil-3-[3,9-dimetil-aminopropilo]carbodiimida (EDC) o éster de N-hidroxisuccinimida (NHS). De manera similar, la misma química se puede usar para conjugar aminas libres en la superficie de un vehículo con carboxilos libres (por ejemplo, del extremo C o de los residuos Asp o Glu) en el péptido o proteína antigénico. Alternativamente, los grupos amino libres en la superficie de un vehículo pueden unirse covalentemente a péptidos y proteínas antigénicos, o al péptido antígeno o proteínas de fusión de proteínas, utilizando la química sulfo-SIAB, esencialmente como describen Arano et al. (1991) Chem. 2:71-6.

30 En otra realización, un enlace no covalente entre un ligando unido al péptido o proteína antigénico y un anti-ligando unido al vehículo puede conjugar el antígeno al vehículo. Por ejemplo, un marcador de secuencia de reconocimiento de biotina ligasa puede unirse al término C de un péptido o proteína antigénico, y este marcador puede ser biotinilado por la biotina ligasa. La biotina puede servir como ligando para conjugar de forma no covalente el péptido o la proteína antigénica a avidina o estreptavidina, que se adsorbe o se une de otro modo a la superficie del vehículo como un anti-ligando. Alternativamente, si los péptidos o proteínas antigénicos se fusionan a un dominio de inmunoglobulina que lleva una región Fc, como se describió anteriormente, el dominio Fc puede actuar como un ligando, y la proteína A, ya sea covalente o no covalentemente unida a la superficie del vehículo, puede servir como el anti-ligando para conjugar de forma no covalente el péptido o proteína antigénico al vehículo. Otros medios son muy conocidos en la técnica y pueden emplearse para conjugar de forma no covalente péptidos antigénicos y proteínas a vehículos, incluyendo técnicas de quelación de iones metálicos (por ejemplo, usando un marcador poli-His en el extremo C del péptido o proteína antigénico o proteínas de fusión de péptidos o proteínas antigénicas, y un vehículo recubierto con Ni<sup>2+</sup>), y estos métodos pueden sustituirse por los descritos en este documento.

35 La conjugación de un resto de ácido nucleico con una molécula de base puede efectuarse de varias formas, que típicamente implican uno o más agentes de reticulación y grupos funcionales en el resto de ácido nucleico y la molécula de base. Los grupos de enlace se agregan a las bases utilizando técnicas estándar de química sintética. Los grupos de enlace se pueden agregar a los restos de ácido nucleico utilizando técnicas sintéticas estándar. El profesional tiene una serie de opciones para los antígenos utilizados en las combinaciones de esta invención. El antígeno inductor presente en la combinación contribuye a la especificidad de la respuesta tolerogénica que se induce. Puede o no ser el mismo que el antígeno diana, que es el antígeno presente o que se colocará en el sujeto que se está tratando, que es una diana para la respuesta inmunológica no deseada y para la cual se desea tolerancia.

50 Un antígeno inductor de esta invención puede ser un polipéptido, polinucleótido, carbohidrato, glicolípido u otra molécula aislada de una fuente biológica, o puede ser una molécula pequeña, polímero o derivado sintetizado químicamente de un material biológico, siempre que tenga la capacidad de inducir tolerancia de acuerdo con esta descripción cuando se combina con el componente de unión a la mucosa.

55 En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un vehículo (por ejemplo, partícula modificadora inmune) acoplado a uno o más péptidos, polipéptidos y/o proteínas. En algunas realizaciones, los vehículos (por ejemplo, el vehículo de PLG), como los descritos en el presente documento, son eficaces para inducir tolerancia específica al antígeno y/o prevenir la aparición de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario (como la EAE en un modelo de ratón) y/o disminuir la gravedad de una enfermedad relacionada con el sistema inmunológico preexistente. En algunas realizaciones, las composiciones y métodos de la presente invención pueden hacer que las células T emprendan eventos tempranos asociados con la activación de las células T, pero no permiten que las

60

células T adquieran una función efectora. Por ejemplo, la administración de las composiciones de la presente invención puede dar como resultado que las células T tengan un fenotipo casi activado, como la regulación positiva de CD69 y/o CD44, pero no muestran la función efectora, como se indica por la falta de la síntesis de IFN- $\gamma$  IL-17. En algunas realizaciones, la administración de las composiciones de la presente invención da como resultado que las células T tengan un fenotipo casi activado sin sufrir la conversión de células T específicas de antígeno naïve en un fenotipo regulador, tales como las que tienen los fenotipos CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup>.

En algunas realizaciones, la superficie del vehículo (por ejemplo, partícula) comprende restos químicos y/o grupos funcionales que permiten la unión (por ejemplo, covalentemente, no covalentemente) de péptidos antigénicos y/u otros elementos funcionales al vehículo. En algunas realizaciones, el número, la orientación, el espaciado, etc., de los restos químicos y/o grupos funcionales en el vehículo (por ejemplo, partícula) varían de acuerdo con la química del vehículo, la aplicación deseada, etc.

En algunas realizaciones, el vehículo comprende uno o más agentes biológicos o químicos adheridos, adsorbidos, encapsulados y/o contenidos en todo el vehículo. En algunas realizaciones, el agente químico o biológico está encapsulado y/o contenido en todas las partículas. La presente invención no está limitada por la naturaleza de los agentes químicos o biológicos. Dichos agentes incluyen, entre otros, proteínas, moléculas de ácido nucleico, fármacos de moléculas pequeñas, lípidos, carbohidratos, células, componentes celulares y similares. En algunas realizaciones, dos o más (por ejemplo, 3, 4, 5, etc.) diferentes agentes químicos o biológicos están incluidos en el vehículo o están dentro de éste. En algunas realizaciones, los agentes están configurados para tasas de liberación específicas. En algunas realizaciones, múltiples agentes diferentes están configurados para diferentes tasas de liberación. Por ejemplo, un primer agente puede liberarse durante un período de horas, mientras que un segundo agente libera durante un período de tiempo más largo (por ejemplo, días, semanas, meses, etc.). En algunas realizaciones, el vehículo o una porción del mismo está configurado para una liberación lenta de los agentes biológicos o químicos. En algunas realizaciones, la liberación lenta proporciona la liberación de cantidades biológicamente activas del agente durante un período de al menos 30 días (por ejemplo, 40 días, 50 días, 60 días, 70 días, 80 días, 90 días, 100 días, 180 días, etc.). En algunas realizaciones, el vehículo o una porción del mismo está configurado para ser suficientemente poroso para permitir el crecimiento de células en los poros. El tamaño de los poros puede seleccionarse para tipos particulares de células de interés y/o para la cantidad de crecimiento deseado.

Se ha encontrado sorprendentemente que la encapsulación de agentes antigénicos, biológicos y/o químicos en la partícula de la invención induce tolerancia inmunológica y tiene varias ventajas. Primero, las partículas encapsuladas tienen una respuesta de citoquinas más lenta. Segundo, cuando se usan múltiples antígenos, agentes biológicos y/o químicos, la encapsulación elimina la competencia que puede ocurrir entre estas diversas moléculas cuando los agentes se unen a la superficie de la partícula. En tercer lugar, la encapsulación permite que más antígenos, agentes biológicos y/o químicos se incorporen a la partícula. En cuarto lugar, la encapsulación permite un uso más fácil de antígenos de proteínas complejas u homogenizados de órganos (por ejemplo, homogeneizado de páncreas para la diabetes tipo 1 o extracto de maní en la alergia al maní). Finalmente, la encapsulación de antígenos, agentes biológicos y/o químicos dentro de la partícula en lugar de la conjugación a la superficie de la partícula mantiene la carga negativa neta en la superficie de la partícula.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona vehículos que tienen células sobre ellas (o en ellas) u otros agentes biológicos o químicos. Cuando se emplean células, los vehículos no están limitados a un tipo particular de células. En algunas realizaciones, los vehículos tienen sobre ellos células de islotes pancreáticos. En algunas realizaciones, los vehículos microporosos tienen adicionalmente proteínas ECM y/o exendina-4. Los vehículos no están limitados a un tipo particular. En algunas realizaciones, un vehículo tiene regiones de porosidad variable (por ejemplo, tamaño de poro variable, profundidad de poro y/o densidad de poros). En algunas realizaciones, los vehículos tienen en su interior (o dentro de estos) agentes farmacéuticos, ADN, ARN, proteínas de la matriz extracelular, exendina-4, etc. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona métodos para transplantar células de islotes pancreáticos con tales vehículos. En ciertas realizaciones de esta invención, el antígeno inductor es una única molécula aislada o producida de forma recombinante. Para tratar afecciones en las que el antígeno diana se disemina hacia varias ubicaciones en el huésped, generalmente es necesario que el antígeno inductor sea idéntico o que esté inmunológicamente relacionado con el antígeno diana. Los ejemplos de tales antígenos son la mayoría de los antígenos polinucleotídicos y algunos antígenos de carbohidratos (como los antígenos de grupos sanguíneos).

Cualquier antígeno adecuado puede encontrar uso. En algunas realizaciones, el antígeno inductor contribuye a la especificidad de la respuesta tolerogénica que se induce. El antígeno inductor puede ser o no el mismo que el antígeno diana, que es el antígeno presente o que se colocará en el sujeto que se está tratando, que es una diana para la respuesta inmunológica no deseada y para la cual se desea la tolerancia.

Cuando el antígeno diana se expresa preferentemente en un órgano, célula o tipo de tejido en particular, el profesional tiene nuevamente la opción de usar un antígeno inductor que sea idéntico o esté inmunológicamente relacionado con el antígeno diana. Sin embargo, también existe la opción adicional de usar un antígeno que sea un observador para la diana. Este es un antígeno que puede no estar relacionado inmunológicamente con el antígeno diana, pero que se expresa preferentemente en un tejido donde se expresa el antígeno diana. Una teoría funcional

sobre la eficacia de la supresión de observadores es que la supresión es un procedimiento activo mediado por células que regula a la baja la herramienta efectora de la respuesta inmune en las células diana. Las células supresoras son estimuladas específicamente por el antígeno inductor en la superficie de la mucosa y se ubican en un sitio de tejido donde se expresa preferentemente el antígeno observador. A través de un mecanismo interactivo o mediado por citoquinas, las células supresoras localizadas regulan a la baja las células efectoras (o inductoras de las células efectoras) en la vecindad, independientemente de contra qué reaccionan. Si las células efectoras son específicas para una diana diferente del antígeno inductor, entonces el resultado es un efecto observador. Para una mayor elaboración de la reacción del observador y una lista de péptidos tolerogénicos que tienen este efecto, se remite al lector a la publicación de la patente internacional WO 93/16724. Una implicación de la teoría del observador es que cualquier experto en la materia no necesita ni identificar ni aislar el antígeno diana particular contra el cual se desea la tolerancia para practicar la presente invención. El profesional solo necesita poder obtener al menos una molécula expresada preferentemente en el sitio diana para su uso como antígeno inductor.

En ciertas realizaciones, el antígeno inductor no está en la misma forma que se expresa en el individuo que se está tratando, sino que es un fragmento o derivado del mismo. Los antígenos inductores de esta invención incluyen péptidos basados en una molécula de la especificidad apropiada pero adaptados por fragmentación, sustitución de residuos, marcaje, conjugación y/o fusión con péptidos que tienen otras propiedades funcionales. La adaptación se puede realizar para cualquier propósito deseable, que incluye, entre otros, la eliminación de cualquier propiedad no deseable, como la toxicidad o la inmunogenicidad; o para mejorar cualquier propiedad deseable, como la unión a la mucosa, la penetración de la mucosa o la estimulación de la herramienta tolerógena de la respuesta inmune. Expresiones como péptido de insulina, péptido de colágeno y péptido de proteína básica de mielina, como se usa en este documento, se refieren no solo a la subunidad intacta, sino también a variantes, fragmentos, péptidos de fusión, conjugados y otros derivados alotípicos y sintéticos que contienen una región que es homóloga (preferiblemente un 70% idéntica, más preferiblemente un 80% idéntica y aún más preferiblemente un 90% idéntica al nivel de aminoácidos) a al menos 10 y preferiblemente 20 aminoácidos consecutivos de la molécula respectiva para la cual es un análogo, en donde la región homóloga del derivado comparte con la molécula parental respectiva la capacidad de inducir tolerancia al antígeno diana.

Se reconoce que las regiones tolerogénicas de un antígeno inductor a menudo son diferentes de los epítomos inmunodominantes para la estimulación de una respuesta de anticuerpos. Las regiones tolerogénicas son generalmente regiones que pueden presentarse en interacciones celulares particulares que implican células T. Las regiones tolerogénicas pueden estar presentes y ser capaces de inducir tolerancia en la presentación del antígeno intacto. Algunos antígenos contienen regiones tolerogénicas crípticas, en el sentido de que el procesamiento y la presentación del antígeno nativo normalmente no desencadenan la tolerancia. Una elaboración de antígenos crípticos y su identificación se encuentra en la publicación de patente internacional WO 94/27634.

En ciertas realizaciones, se usan dos, tres o una pluralidad mayor de antígenos inductores. Puede ser deseable implementar estas realizaciones cuando hay una pluralidad de antígenos diana, o proporcionar una pluralidad de observadores para la diana. Por ejemplo, tanto la insulina como el glucagón pueden mezclarse con un componente de unión a la mucosa en el tratamiento de la diabetes. También puede ser deseable proporcionar un cóctel de antígenos para cubrir varios posibles dianas alternativas. Por ejemplo, un cóctel de fragmentos de antígeno de histocompatibilidad se podría usar para inducir tolerancia a un sujeto previa a un futuro trasplante con un aloinjerto de fenotipo desconocido. Las regiones alovariantes de antígenos de leucocitos humanos son conocidas en la técnica: por ejemplo, Immunogenetics 29: 231, 1989. En otro ejemplo, una mezcla de alérgenos puede servir como antígeno inductor para el tratamiento de la atopía.

Los antígenos inductores pueden prepararse mediante una serie de técnicas conocidas en la técnica, dependiendo de la naturaleza de la molécula. Los antígenos polinucleótidos, polipéptidos y carbohidratos se pueden aislar de las células de las especies a tratar en las que se enriquecen. Los péptidos cortos se preparan convenientemente mediante síntesis de aminoácidos. Las proteínas más largas de secuencia conocida pueden prepararse sintetizando una secuencia de codificación o amplificando por PCR una secuencia de codificación a partir de una fuente natural o vector, y luego expresando la secuencia de codificación en una célula hospedadora bacteriana o eucariótica adecuada.

En ciertas realizaciones, la combinación comprende una mezcla compleja de antígenos obtenidos de una célula o tejido, uno o más de los cuales desempeña el papel de antígeno inductor. Los antígenos pueden estar en forma de células completas, ya sea intactas o tratadas con un fijador como formaldehído, glutaraldehído o alcohol. Los antígenos pueden estar en la forma de un lisado celular, creado por solubilización con detergente o ruptura mecánica de células o tejido, seguido de clarificación. Los antígenos también pueden obtenerse mediante fraccionamiento subcelular, particularmente un enriquecimiento de la membrana plasmática mediante técnicas como la centrifugación diferencial, opcionalmente seguida de la solubilización con detergentes y diálisis. También son adecuadas otras técnicas de separación, tales como la afinidad o la cromatografía de intercambio iónico de proteínas de membrana solubilizadas.

En una realización, el péptido o proteína antigénica es un autoantígeno, un aloantígeno o un antígeno de trasplante. En otra realización particular más, el autoantígeno se selecciona del grupo que consiste en proteína básica de

mielina, colágeno o fragmentos de la misma, ADN, proteínas nucleares y nucleolares, proteínas mitocondriales y proteínas de células  $\beta$  pancreáticas.

5 La descripción proporciona la inducción de tolerancia a un autoantígeno para el tratamiento de enfermedades autoinmunes mediante la administración del antígeno para el que se desea la tolerancia. Por ejemplo, se observan autoanticuerpos dirigidos contra la proteína básica de la mielina (MBP) en pacientes con esclerosis múltiple y, por consiguiente, los péptidos o proteínas antigénicas de la MBP se pueden usar para administrarlos utilizando las composiciones de la presente invención para tratar y prevenir la esclerosis múltiple.

10 A modo de otro ejemplo no limitativo, cualquier individuo que sea candidato para un trasplante de un gemelo no idéntico puede sufrir el rechazo de las células, tejidos u órganos injertados, ya que los antígenos injertados son extraños al receptor. La tolerancia previa del individuo receptor frente al injerto deseado anula o reduce el rechazo posterior. La reducción o eliminación de terapias crónicas anti-rechazo se puede lograr mediante la práctica de la presente invención. En otro ejemplo, muchas enfermedades autoinmunes se caracterizan por una respuesta inmune celular a un antígeno endógeno o autoinmune. La tolerancia del sistema inmunitario frente al antígeno endógeno es deseable para controlar la enfermedad.

15 En un ejemplo adicional, la sensibilización de un individuo frente a un contaminante industrial o químico, como el que se puede encontrar en el trabajo, presenta el peligro de una respuesta inmune. La tolerancia previa del sistema inmunitario del individuo frente al agente químico, en particular en la forma del producto químico reaccionado con las proteínas endógenas del individuo, puede ser deseable para prevenir el desarrollo ocupacional posterior de una respuesta inmune.

20 Los alérgenos son otros antígenos para los cuales también es deseable la tolerancia de la respuesta inmune a los mismos. En una realización, el antígeno es un gliaden. En una realización más, el antígeno es A-gliaden.

25 Es de destacar que, incluso en enfermedades en las que el autoantígeno patógeno es desconocido, la supresión del observador puede ser inducida usando antígenos presentes en la vecindad anatómica. Por ejemplo, se observan autoanticuerpos contra el colágeno en la artritis reumatoide y, en consecuencia, se puede utilizar un gen codificante de colágeno como el módulo del gen que expresa el antígeno para tratar la artritis reumatoide (ver, p. ej. Choy (2000) *Curr Opin Investg Drugs* 1: 58-62). Además, se puede utilizar la tolerancia frente a los autoantígenos de células beta para prevenir el desarrollo de la diabetes tipo 1 (ver, por ejemplo, Bach y Chatenoud (2001) *Ann Rev Immunol* 19: 131-161).

30 Como otro ejemplo, los autoanticuerpos dirigidos contra la glicoproteína oligodendrocítica de la mielina (MOG) se observan en la encefalomiелitis autoinmune y en muchas otras enfermedades del SNC, así como en la esclerosis múltiple (ver, p. ej. Iglesias et al. (2001) *Glia* 36: 22-34). Por consiguiente, el uso de constructos que expresan el antígeno MOG en la invención permite el tratamiento de la esclerosis múltiple, así como trastornos autoinmunes relacionados del sistema nervioso central.

35 Otros ejemplos de autoantígenos candidatos para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes incluyen: antígenos de células beta pancreáticas, insulina y GAD para tratar la diabetes mellitus dependiente de insulina; colágeno tipo 11, cartílago humano gp 39 (HCgp39) y gp130-RAPS para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide; proteína básica de la mielina (MBP), proteína protolípida (PLP) y glicoproteína oligodendrocítica de la mielina (MOG, véase más arriba) para tratar la esclerosis múltiple; fibrilarina y proteína nucleolar pequeña (snoRNP) para tratar la esclerodermia; receptor del factor estimulante de la tiroides (TSH-R) para usar en el tratamiento de la enfermedad de Graves; antígenos nucleares, histonas, glicoproteína gp70 y proteínas ribosómicas para su uso en el tratamiento del lupus eritematoso sistémico; piruvato deshidrogenasa deshidrolipoamida acetiltransferasa (PCD-E2) para su uso en el tratamiento de la cirrosis biliar primaria; antígenos del folículo piloso para su uso en el tratamiento de la alopecia areata; e isoforma 5 (hTM5) de tropomiosina humana para su uso en el tratamiento de la colitis ulcerosa.

45 Se pueden probar combinaciones para determinar su capacidad para promover la tolerancia mediante la realización de experimentos con células aisladas o en modelos animales.

50 En algunas realizaciones, las composiciones inductoras de la tolerancia de la presente invención contienen una molécula de señalización de apoptosis (por ejemplo, además de un péptido antigénico u otra molécula antigénica). En algunas realizaciones, la molécula de señalización de la apoptosis está acoplada y/o asociada con la superficie del vehículo. En algunas realizaciones, las moléculas de señalización apoptótica permiten que un vehículo sea percibido como un cuerpo apoptótico por las células presentadoras de antígeno del huésped, tales como las células del sistema reticuloendotelial del huésped; esto permite la presentación de los epítopos peptídicos asociados de una manera que induce tolerancia. Sin pretender imponer ninguna teoría, se supone que esto previene la regulación positiva de las moléculas involucradas en la estimulación de las células inmunitarias, como el MHC de clase I/II y las moléculas coestimuladoras. Estas moléculas de señalización de la apoptosis también pueden servir como marcadores fagocíticos. Por ejemplo, las moléculas de señalización de apoptosis adecuadas para la presente invención se han descrito en la solicitud de patente de EE.UU. n° 20050113297, que se incorpora en este

documento como referencia en su totalidad. Las moléculas adecuadas para la presente invención incluyen moléculas que se dirigen a fagocitos, que incluyen macrófagos, células dendríticas, monocitos y neutrófilos.

En algunas realizaciones, las moléculas adecuadas como moléculas de señalización apoptótica actúan para mejorar la tolerancia de los péptidos asociados. Además, un vehículo unido a una molécula de señalización apoptótica puede unirse mediante Clq en el reconocimiento de las células apoptóticas (Paidassi et al., (2008) *J. Immunol.* 180: 2329-2338; en este documento incorporado como referencia en su totalidad). Por ejemplo, las moléculas que pueden ser útiles como moléculas de señalización apoptótica incluyen fosfatidil serina, anexina-1, anexina-5, glóbulo de grasa de leche-EGF-factor 8 (MFG-E8), o la familia de trombospondinas (por ejemplo, trombospondina-1 (TSP-1)). Se discuten varias moléculas adecuadas para su uso como moléculas de señalización apoptótica con la presente invención, por ejemplo, en la solicitud de patente U.S. 2012/0076831; en este documento incorporada como referencia en su totalidad).

En algunas realizaciones, la molécula de señalización apoptótica puede conjugarse con el péptido específico de antígeno. En algunos casos, la molécula de señalización apoptótica y el péptido específico del antígeno se conjugan mediante la creación de una proteína de fusión. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender al menos un péptido específico de antígeno (o un fragmento o una variante del mismo) acoplado a al menos una molécula de una molécula de señalización apoptótica (o un fragmento o una variante de la misma). Para la creación de proteínas de fusión, las expresiones "proteína de fusión", "péptido de fusión", "polipéptido de fusión" y "péptido quimérico" se usan de forma intercambiable. Los fragmentos adecuados del péptido específico de antígeno incluyen cualquier fragmento del péptido de longitud completa que retenga la función de generar la función de tolerancia específica de antígeno deseada de la presente invención. La proteína de fusión se puede crear por diversos medios entendidos en la técnica (por ejemplo, fusión genética, conjugación química, etc.). Las dos proteínas pueden fusionarse directamente o mediante un enlazador de aminoácidos. Los polipéptidos que forman la proteína de fusión están típicamente ligados del extremo C al extremo N, aunque también pueden unirse del extremo C al extremo C, del extremo N al extremo N o del extremo N al extremo C. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden. Se puede emplear una secuencia de enlace peptídico para separar los componentes polipeptídicos primero y segundo por una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliegue en sus estructuras secundarias y terciarias. Las secuencias de aminoácidos que pueden emplearse de manera útil como enlazadores incluyen las descritas en Maratea et. al., *Gene* 40: 39-46 (1985); Murphy et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 83: 8258-8262 (1986); Patente de EE.UU. N° 4.935.233 y la patente de EE.UU. N° 4.751.180; se incorporan en este documento como referencia en su totalidad. La secuencia del enlazador generalmente puede tener una longitud de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos. En algunas realizaciones, las secuencias de enlace no son requeridas y/o utilizadas, por ejemplo, cuando el primer y segundo polipéptidos tienen regiones de aminoácidos N-terminales no esenciales que pueden usarse para separar los dominios funcionales y prevenir la interferencia estérica.

Un proxy para la actividad tolerogénica es la capacidad de un antígeno o fragmento intacto para estimular la producción de una citoquina apropiada en el sitio diana. Se cree que la citocina inmunorreguladora liberada por las células T supresoras en el sitio diana es TGF- $\beta$  (Miller et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 89: 421, 1992). Otros factores que pueden producirse durante la tolerancia son las citoquinas IL4 e IL-10, y el mediador PGE. Por el contrario, los linfocitos en los tejidos que experimentan una destrucción inmune activa secretan citoquinas como la IL-1, la IL-2, la IL-6 y la  $\gamma$ -IFN. Por lo tanto, la eficacia de un antígeno inductor candidato puede evaluarse midiendo su capacidad para estimular el tipo apropiado de citoquinas.

Teniendo esto en cuenta, se puede realizar una prueba de detección rápida para detectar epítomos tolerógenos del antígeno inductor, componentes de unión a la mucosa efectivos, combinaciones efectivas o modos y programas efectivos de administración de la mucosa utilizando animales singénicos como donantes para ensayos celulares in vitro. Los animales se tratan en una superficie de la mucosa con la composición de ensayo y, en algún momento, se someten a la administración parenteral del antígeno diana en adyuvante completo de Freund. Se aíslan células de bazo y se cultivan in vitro en presencia del antígeno diana a una concentración de aproximadamente 50  $\mu$ g/ml. El antígeno diana se puede sustituir con proteínas o sub-fragmentos candidatos para mapear la ubicación de los epítomos tolerogénicos. La secreción de citoquinas en el medio se puede cuantificar mediante un inmunoensayo estándar.

La capacidad de las células para suprimir la actividad de otras células se puede determinar utilizando células aisladas de un animal inmunizado con el antígeno diana, o creando una línea celular que responda al antígeno diana (Ben-Nun et al., *Eur. J. Immunol.* 11: 195, 1981, en este documento incorporado como referencia en su totalidad). En una variación de este experimento, la población de células supresoras se irradia levemente (de aproximadamente 1000 a 1250 rads) para prevenir la proliferación, los supresores se cultivan conjuntamente con las células de respuesta, y luego se utiliza la incorporación de timidina tritiada (o MTT) para cuantificar la actividad proliferativa de las células de respuesta. En otra variación, la población de células supresoras y la población de células de respuesta se cultivan en los niveles superior e inferior de un sistema de cultivo de doble cámara Transwell (Costar, Cambridge Massachusetts), que permite que las poblaciones se incuben conjuntamente con 1 mm entre ellas, separadas por una membrana de policarbonato (documento WO 93/16724). En este enfoque, la irradiación de la población de células supresoras es innecesaria, ya que la actividad proliferativa de las células de respuesta se puede medir por separado.

5 En realizaciones en las que el antígeno diana ya está presente en el individuo, no hay necesidad de aislar el antígeno o precombinarlo con el componente de unión a la mucosa. Por ejemplo, el antígeno puede expresarse en el individuo de cierta manera como resultado de una afección patológica (como la enfermedad inflamatoria intestinal o la enfermedad celíaca) o mediante la digestión de un alérgeno alimentario. La prueba se realiza administrando el componente de unión a la mucosa en una o más dosis o formulaciones, y determinando su capacidad para promover la tolerancia frente al antígeno in situ.

10 La efectividad de las composiciones y modos de administración para el tratamiento de enfermedades específicas también se puede elaborar en un modelo de enfermedad animal correspondiente. La capacidad del tratamiento para disminuir o retrasar la sintomatología de la enfermedad se monitoriza con respecto a las propiedades bioquímicas e inmunológicas propias de la enfermedad, la inmunohistología del tejido afectado y las características clínicas generales cuando sea apropiado para el modelo que se está empleando. En la siguiente sección se incluyen ejemplos no limitativos de modelos animales que pueden usarse para las pruebas.

15 La descripción contempla la modulación de la tolerancia mediante la modulación de la respuesta TH1, la respuesta TH2, la respuesta TH17 o una combinación de estas respuestas. La respuesta moduladora de TH1 abarca la expresión cambiante de, por ejemplo, interferón-gamma. La respuesta de TH2 moduladora abarca la expresión cambiante de, por ejemplo, cualquier combinación de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Típicamente, un aumento (disminución) en la respuesta de TH2 comprenderá un aumento (disminución) en la expresión de al menos uno de IL-4, IL-5, IL-10 o IL-13; más típicamente, un aumento (disminución) en la respuesta TH2 comprenderá un aumento en la expresión de al menos dos de IL-4, IL-5, IL-10, o EL-13, lo más típicamente un aumento (disminución) en la respuesta TH2 comprenderá un aumento en al menos tres de DL-4, IL-5, IL-10 o IL-13, mientras que idealmente un aumento (disminución) en la respuesta de TH2 comprenderá un aumento (disminución) en la expresión de todas las IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. La modulación de TH17 abarca el cambio de expresión de, por ejemplo, TGF-beta, IL-6, IL-21 e IL23, y los niveles de efectos de IL-17, IL-21 e IL-22.

25 Otros métodos adecuados para evaluar la efectividad de las composiciones y métodos de la presente invención se encuentran en la técnica, tal como se analizan, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE.UU. 2012/0076831 (incorporada en este documento como referencia en su totalidad).

30 Ciertas realizaciones de esta descripción se refieren al cebado de la tolerancia inmune en un individuo no tolerado previamente por la intervención terapéutica. Estas realizaciones generalmente implican una pluralidad de administraciones de una combinación de antígeno y componente de unión a la mucosa. Por lo general, al menos tres administraciones, con frecuencia al menos cuatro administraciones y, a veces, al menos seis administraciones se realizan durante el cebado para lograr un resultado duradero, aunque el sujeto puede mostrar manifestaciones de tolerancia al inicio del tratamiento. La mayoría de las veces, cada dosis se administra en forma de bolo, pero también son adecuadas formulaciones sostenidas capaces de liberar la mucosa. Cuando se realizan múltiples administraciones, el tiempo entre las administraciones es generalmente entre 1 día y 3 semanas, y típicamente entre aproximadamente 3 días y 2 semanas. En general, el mismo antígeno y el componente de unión a la mucosa están presentes en la misma concentración, y la administración se realiza en la misma superficie de la mucosa, pero pueden adaptarse diversas variaciones de cualquiera de estas variables durante el curso del tratamiento.

40 Otras realizaciones de esta descripción se refieren a reforzar o ampliar la persistencia de la tolerancia inmune previamente establecida. Estas realizaciones generalmente implican la administración o un breve tratamiento en un momento en que la tolerancia establecida disminuye o se encuentra en riesgo de disminuir. El refuerzo generalmente se realiza de 1 mes a 1 año, y generalmente de 2 a 6 meses después del cebado o de un refuerzo previo. Esta descripción también incluye realizaciones que implican el mantenimiento regular de la tolerancia en un programa de administraciones que se realizan cada media semana, semanalmente, cada dos semanas o en cualquier otro programa regular.

45 Las partículas pueden administrarse en cualquier dosis eficaz para amortiguar la respuesta inmune inflamatoria en un sujeto que lo necesite o para tratar una infección bacteriana o viral en un sujeto que lo necesite. En ciertas realizaciones, se proporcionan al individuo de aproximadamente  $10^2$  a aproximadamente  $10^{20}$  partículas. En una realización más, se proporcionan entre aproximadamente  $10^3$  y aproximadamente  $10^{15}$  partículas. En otra realización más, se proporcionan entre aproximadamente  $10^6$  y aproximadamente  $10^{12}$  partículas. En otra realización más, se proporcionan entre aproximadamente  $10^8$  y aproximadamente  $10^{10}$  partículas. En una realización preferida, la dosis preferida es de 0,1% de sólidos/ml. Por lo tanto, para las perlas de  $0,5 \mu\text{m}$ , una dosis preferida es aproximadamente  $4 \times 10^9$  perlas, para las perlas de  $0,05 \mu\text{m}$ , una dosis preferida es aproximadamente  $4 \times 10^{12}$  perlas, para las perlas de  $3 \mu\text{m}$ , una dosis preferida es  $2 \times 10^7$  perlas. Sin embargo, está incluida cualquier dosis que sea eficaz en el tratamiento de la afección particular a tratar.

55 La descripción es útil para el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmune tales como enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplantes y reacciones alérgicas. La sustitución de un sistema de partículas sintéticas y biocompatibles para inducir la tolerancia inmune podría facilitar la fabricación, la amplia disponibilidad de agentes terapéuticos, aumentar la uniformidad entre las muestras, aumentar el número de posibles sitios de tratamiento y reducir drásticamente la posibilidad de respuestas alérgicas a una célula vehículo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta inmune" incluye respuestas inmunes mediadas por células T y/o células B. Las respuestas inmunes ejemplares incluyen respuestas de células T, por ejemplo, la producción de citoquinas y la citotoxicidad celular. Además, la expresión respuesta inmune incluye respuestas inmunes que se efectúan indirectamente mediante la activación de células T, por ejemplo, la producción de anticuerpos (respuestas humorales) y la activación de células sensibles a citoquinas, por ejemplo, macrófagos. Las células inmunes implicadas en la respuesta inmunitaria incluyen linfocitos, tales como células B y células T (células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Th1 y Th2); células presentadoras de antígenos (por ejemplo, células presentadoras de antígenos profesionales tales como células dendríticas, macrófagos, linfocitos B, células de Langerhans y células presentadoras de antígenos no profesionales, tales como queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos, oligodendrocitos); células asesinas naturales; células mieloides, como macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos. En algunas realizaciones, las partículas modificadas de la presente invención son eficaces para reducir el tráfico de células inflamatorias al sitio de inflamación.

Como se usa en el presente documento, el término "anergia", "tolerancia" o la expresión "tolerancia específica de antígeno" se refiere a la insensibilidad de las células T frente a la estimulación mediada por el receptor de células T. Dicha insensibilidad es generalmente específica de antígeno y persiste después de que haya cesado la exposición al péptido antigénico. Por ejemplo, la anergia en las células T se caracteriza por la falta de producción de citocinas, por ejemplo, IL-2. La anergia de las células T se produce cuando las células T se exponen al antígeno y reciben una primera señal (un receptor de células T o una señal mediada por CD-3) en ausencia de una segunda señal (una señal coestimuladora). En estas condiciones, la exposición de nuevo de las células al mismo antígeno (incluso si se produce una exposición más en presencia de una molécula coestimuladora) produce una falta en la producción de citoquinas y, consecuentemente, una falta en la proliferación. Por lo tanto, la falta de producción de citoquinas evita la proliferación. Sin embargo, las células T anérgicas pueden proliferar si se cultivan con citoquinas (por ejemplo, IL-2). Por ejemplo, la anergia de las células T también puede observarse por la falta de producción de IL-2 por los linfocitos T, medida por ELISA o por un ensayo de proliferación utilizando una línea de células indicadoras. Alternativamente, se puede usar una construcción de gen indicador. Por ejemplo, las células T anérgicas no pueden iniciar la transcripción del gen DL-2 inducida por un promotor heterólogo bajo el control del potenciador del gen IL-2 de 5' o por un multímero de la secuencia API que puede encontrarse dentro del potenciador (Kang et al. 1992 Science, 257:1134).

Como se usa en el presente documento, la expresión "tolerancia inmunológica" se refiere a los métodos realizados en una proporción de sujetos tratados en comparación con sujetos no tratados donde: a) un nivel menor de una respuesta inmunológica específica (pensada para estar mediada, al menos en parte, por linfocitos T efectores específicos del antígeno, linfocitos B, anticuerpos o sus equivalentes); b) un retraso en la aparición o progresión de una respuesta inmunológica específica; o c) un menor riesgo de aparición o progresión de una respuesta inmunológica específica. La tolerancia inmunológica "específica" se produce cuando la tolerancia inmunológica se induce preferentemente contra ciertos antígenos en comparación con otros. La tolerancia inmunológica "no específica" ocurre cuando la tolerancia inmunológica se induce indiscriminadamente contra los antígenos que conducen a una respuesta inmune inflamatoria. La tolerancia inmunológica "cuasi específica" se produce cuando se induce la tolerancia inmunológica de forma semi-discriminatoria contra los antígenos que conducen a una respuesta inmune patógena, pero no a otros que conducen a una respuesta inmune protectora.

La tolerancia frente a los autoantígenos y la enfermedad autoinmune se logra mediante una variedad de mecanismos que incluyen la selección negativa de células T auto-reactivas en el timo y mecanismos de tolerancia periférica para aquellas células T autorreactivas que escapan a la delección tímica y se encuentran en la periferia. Los ejemplos de mecanismos que proporcionan tolerancia a las células T periféricas incluyen la "ignorancia" de los antígenos propios, la anergia o la falta de respuesta al autoantígeno, la desviación inmune de las citoquinas y la muerte celular inducida por la activación de las células T autorreactivas. Además, se ha demostrado que las células T reguladoras están involucradas en la mediación de la tolerancia periférica. Véase, por ejemplo, Walker et al. (2002) Nat. Rev. Immunol. 2: 11-19; Shevach et al. (2001) Immunol. Rev. 182:58-67. En algunas situaciones, la tolerancia periférica a un autoantígeno se pierde (o se rompe) y se produce una respuesta autoinmune. Por ejemplo, en un modelo animal para la EAE, se demostró que la activación de las células presentadoras de antígeno (APC) a través de los receptores inmunes innatos de TLR rompe la auto-tolerancia y da como resultado la inducción de la EAE (Waldner et al. (2004) J. Clin. Invest. 113:990-997).

En consecuencia, en algunas realizaciones, la descripción proporciona métodos para aumentar la presentación de antígenos al tiempo que suprime o reduce la estimulación celular dependiente de TLR7/8, TLR9 y/o TLR 7/8/9. Como se describe en este documento, la administración de partículas modificadas particulares da como resultado la presentación de antígenos por DC o APC al tiempo que suprime las respuestas de las células dependientes de TLR 7/8, TLR9 y/o TLR7/8/9 asociadas con polinucleótidos inmunoestimuladores. Dicha supresión puede incluir niveles menores de una o más citoquinas asociadas a TLR.

Como se discutió anteriormente, esta descripción proporciona nuevos compuestos que tienen propiedades biológicas útiles para el tratamiento de trastornos mediados por Mac-1 y LFA-1.

Por consiguiente, en otro aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden las partículas modificadoras de la inmunidad y, opcionalmente, comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas

realizaciones, estas composiciones comprenden además opcionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales. Alternativamente, las partículas modificadas de la presente invención pueden administrarse a un paciente que lo necesite en combinación con la administración de uno o más agentes terapéuticos. Por ejemplo, los agentes terapéuticos adicionales para la administración conjunta o la inclusión en una composición farmacéutica con un compuesto de esta invención pueden ser un agente antiinflamatorio aprobado, o puede ser uno cualquiera de varios agentes en proceso de aprobación en la Administración de Medicamentos y Alimentos que, en última instancia, obtengan la aprobación para el tratamiento de cualquier trastorno caracterizado por una respuesta inmune inflamatoria no controlada o una infección bacteriana o viral. También se apreciará que algunas de las partículas modificadas de la presente invención pueden existir en forma libre para el tratamiento o, cuando sea apropiado, como un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, que, como se usa en el presente documento, incluye todos y cada uno de los disolventes, diluyentes u otros vehículos líquidos, agentes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglomerantes sólidos, lubricantes y similares, adecuados para la forma de dosificación particular deseada. Remington's Pharmaceutical Sciences, Decimosexta edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, PA, 1980) describe varios vehículos utilizados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de los mismos. Excepto en la medida en que cualquier medio vehículo convencional sea incompatible con los compuestos de la invención, tal como cuando se produce cualquier efecto biológico indeseado o se interactúa de otra manera de forma perjudicial con cualquier otro componente o componentes de la composición farmacéutica, es contemplado su uso dentro del alcance de esta invención. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como el almidón de maíz y el almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como la carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como la manteca de cacao y las ceras para supositorios; aceites tales como el aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo, aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles; tales como el propilenglicol; ésteres tales como el oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes tales como el hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico y soluciones de tampón fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos, como el laurilsulfato de sodio y el estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en la composición, según el criterio del formulador.

Las formas de dosificación líquidas para la administración oral incluyen, entre otras, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, maní, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes y perfumantes.

Las partículas pueden administrarse por vía oral, nasal, intravenosa, intramuscular, ocular, transdérmica, intraperitoneal o subcutánea. En una realización, las partículas de la invención se administran por vía intravenosa.

Las cantidades efectivas y el método de administración de la presente descripción para la modulación de una respuesta inmune pueden variar en función del individuo, qué condición se va a tratar y otros factores evidentes para los expertos en la materia. Los factores a considerar incluyen la vía de administración y el número de dosis a administrar. Tales factores son conocidos en la técnica y se encuentran dentro de la habilidad de los expertos en la materia hacer tales determinaciones sin excesiva experimentación. Un intervalo de dosificación adecuado es aquel que proporciona la regulación deseada de inmunidad. Los intervalos de dosificación útiles del vehículo, dados en cantidades de vehículo administrados, pueden ser, por ejemplo, aproximadamente cualquiera de los siguientes: de 0,5 a 10 mg/kg, de 1 a 9 mg/kg, de 2 a 8 mg/kg, de 3 a 7 mg/kg, de 4 a 6 mg/kg, 5 mg/kg, de 1 a 10 mg/kg, de 5 a 10 mg/kg. Alternativamente, la dosis se puede administrar en función del número de partículas. Por ejemplo, las dosis útiles del vehículo, dadas en cantidades de vehículo administrado, pueden ser, por ejemplo, aproximadamente  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ , o un número mayor de partículas por dosis. La cantidad absoluta administrada a cada paciente depende de las propiedades farmacológicas, como la biodisponibilidad, la tasa de eliminación y la vía de administración. Los detalles de los vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables y los métodos de preparación de composiciones y formulaciones farmacéuticas se proporcionan en Remington's Pharmaceutical Sciences 18ª edición, 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa., EE. UU., que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad.

La cantidad efectiva y el método de administración de la formulación del vehículo particular pueden variar según el paciente individual, el resultado deseado y/o el tipo de trastorno, la etapa de la enfermedad y otros factores evidentes para cualquier experto en la técnica. La ruta o rutas de administración útiles en cada aplicación particular

son evidentes para los expertos en la técnica. Las vías de administración incluyen, entre otras, las tópicas, dérmicas, transdérmicas, transmucosas, epidérmicas, parenterales, gastrointestinales y naso-faríngeas y pulmonares, incluyendo transbronquiales y transalveolares. Un intervalo de dosificación adecuado es uno que proporcione una composición que contenga el IRP suficiente para alcanzar una concentración tisular de aproximadamente 1-50  $\mu\text{M}$ , medida por los niveles en sangre. La cantidad absoluta administrada a cada paciente depende de las propiedades farmacológicas, como la biodisponibilidad, la tasa de eliminación y la vía de administración.

La presente descripción proporciona formulaciones de vehículos adecuadas para la aplicación tópica que incluyen, entre otros, implantes, pomadas, cremas, enjuagues y geles fisiológicamente aceptables. Las vías ejemplares de administración dérmica son aquellas que son menos invasivas, tales como la transmisión transdérmica, la administración epidérmica y la inyección subcutánea.

La administración transdérmica se realiza mediante la aplicación de una crema, enjuague, gel, etc. capaz de permitir que el vehículo penetre en la piel y entre en el torrente sanguíneo. Las composiciones adecuadas para la administración transdérmica incluyen, entre otras, las suspensiones, aceites, cremas y pomadas farmacéuticamente aceptables aplicados directamente a la piel o incorporados en un vehículo protector tal como un dispositivo transdérmico (llamado "parche"). Se pueden encontrar ejemplos de cremas, ungüentos, etc. adecuados, por ejemplo, en la Physician Desk Reference. La transmisión transdérmica también se puede lograr mediante iontoforesis, por ejemplo, utilizando parches disponibles en el mercado que entregan su producto continuamente a través de la piel intacta durante períodos de varios días o más. El uso de este método permite la transmisión controlada de composiciones farmacéuticas en concentraciones relativamente grandes, permite la infusión de fármacos de combinación y permite el uso contemporáneo de un promotor de la absorción.

Las vías de administración parenteral incluyen, entre otras, inyección eléctrica (iontoforesis) o directa, como la inyección directa en una línea venosa central, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o inyección subcutánea. Las formulaciones del vehículo adecuado para la administración parenteral se formulan generalmente en agua USP o agua para inyección y pueden comprender además tampones de pH, agentes de carga de sales, conservantes y otros excipientes farmacéuticamente aceptables. El polinucleótido inmunorregulador para la inyección parenteral puede formularse en soluciones isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, como una solución salina y solución salina tamponada con fosfato para la inyección.

Las vías de administración gastrointestinales incluyen, entre otras, las vías por ingestión y rectales y pueden incluir el uso de, por ejemplo, polvos, píldoras o líquidos farmacéuticamente aceptables para la ingestión y supositorios para la administración rectal.

Las administraciones nasofaríngeas y pulmonares incluyen la inhalación e incluyen vías de administración como la intranasal, transbronquial y transalveolar. La invención incluye formulaciones de vehículos adecuados para la administración por inhalación que incluyen, entre otros, suspensiones líquidas para formar aerosoles así como formas en polvo para sistemas de administración por inhalación de polvo seco. Los dispositivos adecuados para la administración por inhalación de formulaciones de vehículos incluyen, entre otros, atomizadores, vaporizadores, nebulizadores y dispositivos de administración por inhalación en polvo seco.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, la solución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como disolventes o medios de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo insípido, incluidos mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos como el ácido oleico se utilizan en la preparación de inyectables.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención bacteriana, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

Con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, a menudo es deseable disminuir la absorción del fármaco de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida o material cristalino o amorfo con poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso. Las formas de depósito inyectables se hacen formando matrices de microencapsulas del fármaco en polímeros biodegradables, como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la relación de fármaco a polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen (poli(ortoésteres) y poli(anhídridos)). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

En algunas realizaciones, las partículas sintéticas y biodegradables de la presente invención proporcionan facilidad de fabricación, amplia disponibilidad de agentes terapéuticos y más sitios de tratamiento. En realizaciones particulares, las partículas de poli(lactida-co-glicólido) biodegradables funcionalizadas en la superficie con una alta densidad de grupos carboxilato de superficie, sintetizadas usando el surfactante poli(etileno-alt-anhídrido maleico) proporcionan un vehículo que ofrece numerosas ventajas respecto a otras partículas de vehículo y/o superficies. Los experimentos realizados durante el desarrollo de realizaciones de la presente invención demostraron la conjugación de péptidos (por ejemplo, péptido PLP<sub>139-151</sub>) a estas partículas. Dichas partículas acopladas a péptidos han demostrado que son efectivas para la prevención del desarrollo de la enfermedad y la inducción de tolerancia inmunológica (por ejemplo, en el modelo murino R-EAE inducido por SJL/J PLP<sub>139-151</sub>/CFA de la esclerosis múltiple). Los vehículos acoplados a péptidos de la presente invención proporcionan numerosas ventajas respecto a otras estructuras de inducción de la tolerancia. En algunas realizaciones, las partículas son biodegradables y, por lo tanto, no persisten durante mucho tiempo en el cuerpo. El tiempo de degradación completa puede ser controlado. En algunas realizaciones, las partículas se funcionalizan para facilitar la internalización sin activación celular (por ejemplo, fosfatidilserina cargada en microesferas de PLG). En algunas realizaciones, las partículas incorporan ligandos dirigidos a una población celular específica. En algunas realizaciones, las citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 y el TGF- $\beta$ , se incluyen o están dentro de las partículas para limitar la activación del tipo de célula que está internalizando las partículas y para facilitar la inducción de la tolerancia a través de la energía y/o la eliminación, y la activación de células T reguladoras.

Las formas de dosificación sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, tabletas, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, las partículas modificadas se mezclan con al menos un excipiente o vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable, tal como el citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o a) rellenos o diluyentes tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, c) humectantes tales como el glicerol, d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, patata o almidón de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio, e) agentes retardadores de la solución como la parafina, f) aceleradores de la absorción como los compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes como, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como el caolín y la arcilla de bentonita, y i) lubricantes tales como el talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y sus mezclas. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes tamponantes.

También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes como la lactosa o el azúcar de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y envolturas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos muy conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Opcionalmente, pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de una composición que liberen el ingrediente o los ingredientes activos solamente, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como rellenos en cápsulas de gelatina blandas y rellenas que utilizan excipientes como lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las partículas modificadas también pueden estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes como se indicó anteriormente. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y envolturas tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos que controlan la liberación y otros recubrimientos muy conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como la sacarosa, la lactosa y el almidón. Dichas formas de dosificación también pueden comprender, como en la práctica normal, otras sustancias distintas de los diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes para la formación de comprimidos y otros adyuvantes para la formación de comprimidos tales como el estearato de magnesio y la celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponantes. Opcionalmente, pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de una composición que liberen las partículas modificadas solo, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

La presente descripción abarca formulaciones tópicas farmacéuticamente aceptables de las partículas modificadas de la invención. La expresión "formulación tópica farmacéuticamente aceptable", como se usa en este documento, significa cualquier formulación que sea farmacéuticamente aceptable para la administración intradérmica de micropartículas modificadas de la invención mediante la aplicación de la formulación a la epidermis. En ciertas realizaciones, la formulación tópica comprende un sistema vehículo. Los vehículos farmacéuticamente efectivos incluyen, entre otros, disolventes (por ejemplo, alcoholes, poli-alcoholes, agua), cremas, lociones, pomadas, aceites, emplastos, liposomas, polvos, emulsiones, microemulsiones y soluciones tamponadas (por ejemplo, soluciones salinas hipotónicas o tamponadas) o cualquier otro vehículo conocido en la técnica para la administración tópica de productos farmacéuticos. Una lista más completa de vehículos conocidos en la técnica se proporciona mediante textos de referencia que son estándar en la técnica, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición,

1980 y 17ª edición, 1985, ambos publicados por Mack Publishing Company, Easton, Pa., cuyas descripciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. En ciertas otras realizaciones, las formulaciones tópicas de la invención pueden comprender excipientes. Cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable conocido en la técnica puede usarse para preparar las formulaciones tópicas farmacéuticamente aceptables de la invención.

5 Los ejemplos de excipientes que pueden incluirse en las formulaciones tópicas de la invención incluyen, entre otros, conservantes, antioxidantes, humectantes, emolientes, agentes tamponantes, agentes solubilizantes, otros agentes de penetración, protectores de la piel, tensioactivos y propelentes, y o agentes terapéuticos adicionales usados en combinación con las partículas modificadas. Los conservantes adecuados incluyen, entre otros, alcoholes, aminos cuaternarias, ácidos orgánicos, parabenos y fenoles. Los antioxidantes adecuados incluyen, entre otros, ácido

10 ascórbico y sus ésteres, bisulfito de sodio, hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado, tocoferoles y agentes quelantes como EDTA y ácido cítrico. Los humectantes adecuados incluyen, entre otros, glicerina, sorbitol, polietilenglicoles, urea y propilenglicol. Los agentes tamponantes adecuados para uso con la invención incluyen, entre otros, tampones de ácido cítrico, clorhídrico y láctico. Los agentes solubilizantes adecuados incluyen, entre otros, cloruros de amonio cuaternario, ciclodextrinas, benzoato de bencilo, lecitina y polisorbatos. Los protectores de

15 la piel adecuados que pueden usarse en las formulaciones tópicas de la invención incluyen, entre otros, aceite de vitamina E, alatoína, dimeticona, glicerina, vaselina y óxido de zinc.

En ciertas realizaciones, las formulaciones tópicas farmacéuticamente aceptables comprenden al menos las partículas modificadas de la invención y un agente que mejora la penetración. La elección de la formulación tópica dependerá de varios factores, incluida la condición a tratar, las características fisicoquímicas del compuesto inventivo y otros excipientes presentes, su estabilidad en la formulación, el equipo de fabricación disponible y las restricciones de costes. Como se usa en el presente documento, la expresión "agente mejorador de la penetración" significa un agente capaz de transportar un compuesto farmacológicamente activo a través del estrato córneo y dentro de la epidermis o dermis, preferiblemente, con poca o ninguna absorción sistémica. Se ha evaluado una amplia variedad de compuestos en cuanto a su efectividad para mejorar la tasa de penetración de medicamentos a través de la piel. Véase, por ejemplo, Percutaneous Penetration Enhancers, Maibach HI y Smith HE (eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1995), que analiza el uso y las pruebas de varios mejoradores de la penetración de la piel, y Buyuktimkin et al., Chemical Means of Transdermal Drug Permeation Enhancement in Transdermal and Topical Drug Delivery Systems, Gosh TK, Pfister WR, Yum SI (Eds.), Interpharm Press Inc., Buffalo Grove, IL (1997). En ciertas realizaciones ejemplares, los agentes de penetración para uso con la invención incluyen, entre

20 otros, triglicéridos (por ejemplo, aceite de soja), composiciones de aloe (por ejemplo, gel de aloe vera), alcohol etílico, alcohol isopropílico, octilfenilpolietilenglicol, ácido oleico, polietilenglicol 400, propilenglicol, N-decilmethylsulfóxido, ésteres de ácidos grasos (p. ej., miristato de isopropilo, laurato de metilo, monooleato de glicerol y monooleato de propilenglicol) y N-metilpirrolidona.

En ciertas realizaciones, las composiciones pueden estar en forma de ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, inhalantes o parches. En ciertas realizaciones ejemplares, las formulaciones de las composiciones de acuerdo con la invención son cremas, que pueden contener además ácidos grasos saturados o insaturados tales como ácido esteárico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido palmito-oleico, alcoholes cetílicos u oleílicos, siendo particularmente preferido el ácido esteárico. Las cremas de la invención también pueden contener un tensioactivo no iónico, por ejemplo, estearato de polioxi-40. En ciertas realizaciones, el componente activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o tampón necesario que pueda requerirse. La formulación oftálmica, las gotas para los oídos y las gotas para los ojos también se consideran dentro del alcance de esta invención. Además, la presente invención contempla el uso de parches transdérmicos, que tienen la ventaja adicional de proporcionar un suministro controlado de un compuesto al cuerpo. Dichas formas de dosificación se hacen disolviendo o dispensando el compuesto en el medio apropiado. Como se

35 discutió anteriormente, los agentes que mejoran la penetración también pueden usarse para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad puede controlarse proporcionando una membrana de control de velocidad o dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel.

Las partículas modificadas pueden administrarse por aerosol. Esto se logra preparando un aerosol acuoso, una preparación liposómica o partículas sólidas que contienen las partículas modificadas. Se podría usar una suspensión no acuosa (por ejemplo, propelente de fluorocarbono).

50

Normalmente, se hace un aerosol acuoso formulando una solución o suspensión acuosa del agente junto con vehículos y estabilizantes farmacéuticamente aceptables convencionales. Los vehículos y estabilizadores varían con los requisitos del compuesto en particular, pero típicamente incluyen tensioactivos no iónicos (Tweens, Pluronic o polietilenglicol), proteínas inocuas como la albúmina sérica, ésteres de sorbitán, ácido oleico, lecitina, aminoácidos tales como la glicina, tampones, sales, azúcares o alcoholes de azúcar. Los aerosoles generalmente se preparan a partir de soluciones isotónicas.

55

También se apreciará que las partículas modificadas y las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse y emplearse en terapias de combinación, es decir, los compuestos y composiciones farmacéuticas pueden formularse o administrarse simultáneamente con, antes o después de una o más distintas terapias o procedimientos médicos deseados. La combinación particular de terapias (terapéuticas o procedimientos) a emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de las terapias y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico que se desea lograr. También se apreciará que las terapias empleadas pueden

60

lograr un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, un compuesto de la invención puede administrarse simultáneamente con otro agente antiinflamatorio), o pueden lograr diferentes efectos (por ejemplo, control de cualquier efecto adverso).

5 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que contienen las partículas modificadas de la presente invención comprenden además uno o más ingredientes terapéuticamente activos adicionales (por ejemplo, antiinflamatorios y/o paliativos). Para los fines de la invención, el término "paliativo" se refiere al tratamiento que se enfoca en el alivio de los síntomas de una enfermedad y/o los efectos secundarios de un régimen terapéutico, pero no es curativo. Por ejemplo, el tratamiento paliativo incluye analgésicos, medicamentos contra las náuseas y medicamentos contra las enfermedades.

10 La descripción proporciona métodos para regular una respuesta inmune en un individuo, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, que comprende administrar al individuo las partículas modificadas descritas en este documento. Los métodos de inmunorregulación proporcionados por la invención incluyen aquellos que suprimen y/o inhiben una respuesta inmune innata o una respuesta inmune adaptativa, que incluyen, entre otras, una respuesta inmune estimulada por polipéptidos inmunoestimulantes o componentes virales o bacterianos.

15 Las partículas modificadas se administran en una cantidad suficiente para regular una respuesta inmune. Como se describe en el presente documento, la regulación de una respuesta inmune puede ser humoral y/o celular, y se mide utilizando técnicas estándar en la técnica y como se describe en el presente documento.

20 En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento se administran junto con (por ejemplo, simultáneamente, antes o después) un implante (por ejemplo, dispositivo) y/o trasplante (por ejemplo, tejido, células, órgano) para mediar, negar, regular y/o reducir la respuesta inmune asociada a la misma.

25 En ciertas realizaciones, el individuo padece un trastorno asociado con la activación inmune no deseada, tal como una enfermedad o afección alérgica, alergia y asma. Un individuo que tiene una enfermedad alérgica o asma es un individuo con un síntoma reconocible de una enfermedad alérgica existente o asma. La tolerancia puede ser inducida en tal individuo, por ejemplo, por partículas complejadas con los alimentos específicos (por ejemplo, proteínas de maní, etc.), sustancias inyectadas (por ejemplo, proteínas de veneno de abeja, etc.), o sustancias inhaladas (por ejemplo, proteínas de polen de ambrosía, proteínas de la caspa de mascotas, etc.) que provocan la reacción alérgica.

30 En ciertas realizaciones, el individuo padece un trastorno asociado con una activación inmune no deseada, tal como una enfermedad autoinmune y una enfermedad inflamatoria. Un individuo que tiene una enfermedad autoinmune o enfermedad inflamatoria es un individuo con un síntoma reconocible de una enfermedad autoinmune existente o una enfermedad inflamatoria. La tolerancia puede ser inducida en tal individuo, por ejemplo, por partículas en complejo con los autoantígenos relevantes que conducen a la enfermedad autoinmune particular.

35 En ciertas realizaciones, el individuo sufre de un trastorno asociado con una terapia de reemplazo enzimático. La tolerancia puede ser inducida en un individuo de este tipo, por ejemplo, mediante partículas complejadas con las enzimas que los pacientes con deficiencias genéticas no producen para evitar que generen respuestas neutralizantes a las enzimas producidas de forma recombinante administradas para tratar su deficiencia particular, p. ej. la tolerancia al Factor VIII humano en pacientes con hemofilia debido a una deficiencia genética en la capacidad de producir el Factor VIII.

40 En ciertas realizaciones, el individuo sufre de un trastorno asociado con la terapia de la enfermedad. En el caso de anticuerpos recombinantes, la tolerancia se induce, por ejemplo, a un anticuerpo humanizado que se emplea en un contexto terapéutico para evitar que un paciente produzca anticuerpos neutralizantes contra el anticuerpo terapéutico, p. ej. la tolerancia a un subconjunto inmune humanizado que elimina el anticuerpo o un anticuerpo anti-citoquina como tratamiento para la enfermedad autoinmune.

45 Las enfermedades autoinmunes se pueden dividir en dos categorías amplias: específicas de órgano y sistémicas. Las enfermedades autoinmunes incluyen, sin limitación, la artritis reumatoide (AR), el lupus eritematoso sistémico (LES), la diabetes mellitus tipo I, diabetes mellitus tipo II, esclerosis múltiple (EM), infertilidad mediada por el sistema inmunitario como la insuficiencia ovárica prematura, esclerodermia, enfermedad de Sjogren, vitiligo, alopecia (calvicie), insuficiencia poliglandular, enfermedad de Grave, hipotiroidismo, polimiositis, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, enfermedad inflamatoria del intestino que incluye la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, hepatitis autoinmunitaria, incluida la asociada con el virus de la hepatitis B (VHB) y la hepatitis C (VHC), hipopituitarismo, enfermedad de injerto contra huésped (GvHD), miocarditis, enfermedad de Addison, enfermedades cutáneas autoinmunes, uveítis, anemia perniciosa, enfermedad celíaca e hipoparatiroidismo.

55 Las enfermedades autoinmunes también pueden incluir, sin limitación, de la tiroiditis de Hashimoto, síndromes poliglandulares autoinmunes Tipo I y Tipo II, pénfigo paraneoplásico, Bullus pénfigoide, dermatitis herpetiforme, enfermedad IgA lineal, epidermolísis bullosa, nodosa eritema, pénfigoide gestacional, pénfigoide cicatricial, crioglobulinemia mixta esencial, enfermedad bullosa crónica de la niñez, anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica, síndrome de Goodpasture, neutropenia autoinmune, miastenia gravis, síndrome miasténico de Eaton-Lambert, síndrome del hombre rígido, encefalomielitis diseminada aguda, síndrome de Guillain-Barre,

polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, neuropatía motora multifocal con bloqueo de la conducción, neuropatía crónica con gammapatía monoclonal, síndrome opsonoclonio-mioclonio, degeneración cerebelosa, encefalomiелitis, retinopatía, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, enteropatía sensible al gluten, espondilitis anquilosante, artritis epidémica reactiva, polimiositis/dermatomiositis, enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome de Bechet, psoriasis, poliarteritis nodosa, anguitis alérgica y granulomatosis (enfermedad de Churg-Strauss), síndrome de solapamiento de la poliangitis, vasculitis de la hipersensibilidad, granulomatosis de Wegener, arteritis temporal, arteria de Takayasu, enfermedad de Kawasaki, vasculitis aislada del sistema nervioso central, tromboangiitis obliterans, sarcoidosis, glomerulonefritis y criopatías. Estas condiciones son muy conocidas en las técnicas médicas y se describen, por ejemplo, en Harrison's Principles of Internal Medicine, 14ª edición, Fauci A S et al., Eds., Nueva York: McGraw-Hill, 1998.

Los modelos animales para el estudio de enfermedades autoinmunes son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los modelos animales que parecen más similares a la enfermedad autoinmune humana incluyen cepas de animales que desarrollan espontáneamente una alta incidencia de una enfermedad en particular. Los ejemplos de dichos modelos incluyen, entre otros, el del ratón no obeso diabético (NOD), que desarrolla una enfermedad similar a la diabetes tipo 1, y los animales propensos a la enfermedad tipo lupus, como los ratones híbridos de Nueva Zelanda, MRL-Fas<sup>pr</sup> y BXSB. Los modelos animales en los que se ha inducido una enfermedad autoinmune incluyen, entre otros, encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), que es un modelo para la esclerosis múltiple, artritis inducida por colágeno (CIA), que es un modelo para la artritis reumatoide y la uveítis autoinmune experimental (EAU), que es un modelo para la uveítis. También se han creado modelos animales para enfermedades autoinmunes mediante manipulación genética e incluyen, por ejemplo, ratones knock-out IL-2/IL-10 para la enfermedad inflamatoria del intestino, knockout del ligando Fas o Fas para el LES, y knockout antagonista del receptor IL-1 para la artritis reumatoide.

En ciertas realizaciones, el individuo sufre de una infección bacteriana o viral. Un individuo que tiene una infección bacteriana o viral es un individuo con un síntoma reconocible de una infección bacteriana o viral existente.

Una lista no limitante de infecciones virales tratables con las partículas modificadas de la presente invención incluye infecciones por el virus del herpes, infecciones por el virus de la hepatitis, infecciones por el virus del Nilo occidental, infecciones por flavivirus, infecciones por el virus de la influenza, infecciones por rinovirus, infecciones por papilomavirus, infecciones por paromixovirus, infecciones por el virus parainfluenza, y las infecciones por retrovirus. Los virus preferidos son aquellos virus que infectan el sistema nervioso central del sujeto. Los virus más preferidos son aquellos que causan encefalitis o meningitis.

Una lista no limitante de infecciones bacterianas tratables con las partículas modificadas de la presente invención incluye infecciones por estafilococos, infecciones por estreptococos, infecciones por micobacterias, infecciones por bacilos, infecciones por Salmonella, infecciones por Vibrio, infecciones por espiroquetas e infecciones por Neisseria. Se prefieren las bacterias que infectan el sistema nervioso central del sujeto. Las más preferidas son las bacterias que causan encefalitis o meningitis.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a usos de composiciones de esta invención antes del inicio de la enfermedad. En otras realizaciones, la descripción se refiere a usos de las composiciones para inhibir la enfermedad en curso. En algunas realizaciones, la descripción se refiere a la mejora de la enfermedad en un sujeto. Al mejorar la enfermedad en un sujeto se pretende incluir el tratamiento, la prevención o la supresión de la enfermedad en el sujeto.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a prevenir la recaída de la enfermedad. Por ejemplo, una respuesta inmune no deseada puede ocurrir en una región de un péptido (como un determinante antigénico). La recaída de una enfermedad asociada con una respuesta inmune no deseada puede ocurrir al tener un ataque de respuesta inmune en una región diferente del péptido. Dado que las partículas modificadoras inmunes de la presente invención no tienen péptidos unidos ni restos antigénicos, las partículas serán eficaces contra múltiples epítomos. Las respuestas de las células T en algunos trastornos de la respuesta inmunitaria, como la esclerosis múltiple y otras enfermedades autoinmunes mediadas por Th1/17, pueden ser dinámicas y evolucionar durante el curso de la enfermedad recidivante-remitente y/o progresiva crónica. La naturaleza dinámica del repertorio de células T tiene implicaciones para el tratamiento de ciertas enfermedades, ya que la diana puede cambiar a medida que avanza la enfermedad. Anteriormente, el conocimiento preexistente del patrón de respuestas era necesario para predecir la progresión de la enfermedad. La presente invención proporciona composiciones que pueden prevenir el efecto de la enfermedad de cambio dinámico, una función de la "propagación del epítomo". Un modelo conocido de recaída es una reacción inmune a la proteína proteolípídica (PLP) como modelo para la esclerosis múltiple (EM). La respuesta inmune inicial puede ocurrir por una respuesta a PLP<sub>139-15</sub>. El inicio de la enfermedad posterior puede ocurrir por una respuesta inmune de recaída frente a PLP<sub>[pi]s-iβi</sub>.

Otras realizaciones de esta descripción se refieren a los trasplantes. Esto se refiere a la transferencia de una muestra de tejido o injerto de un individuo donante a un individuo receptor, y se realiza con frecuencia en receptores humanos que necesitan el tejido para restaurar una función fisiológica proporcionada por el tejido. Los tejidos que se trasplantan incluyen (entre otros) órganos completos como riñón, hígado, corazón, pulmón; componentes orgánicos como los injertos de piel y la córnea del ojo; y suspensiones celulares tales como células de médula ósea y cultivos

de células seleccionadas y expandidas a partir de médula ósea o sangre en circulación, y transfusiones de sangre total.

5 Una grave complicación potencial de cualquier trasplante se debe a las diferencias antigénicas entre el receptor y el tejido injertado. Dependiendo de la naturaleza y el grado de la diferencia, puede haber un riesgo de un ataque inmunológico del injerto por parte del huésped, o del huésped por el injerto, o ambos pueden ocurrir. La extensión del riesgo se determina siguiendo el patrón de respuesta en una población de sujetos tratados de manera similar con un fenotipo similar, y correlacionando los diversos factores contribuyentes posibles de acuerdo con procedimientos clínicos muy aceptados. El ataque inmunológico puede ser el resultado de una respuesta inmunológica preexistente (como un anticuerpo preformado), o una que se inicia aproximadamente en el momento del trasplante (como la generación de células TH). El anticuerpo, las células TH o las células Tc pueden participar en cualquier combinación entre sí y con diversas moléculas y células efectoras. Sin embargo, los antígenos que están implicados en la respuesta inmune generalmente no se conocen, por lo que presentan dificultades para diseñar terapias específicas de antígenos o inducir tolerancia específica de antígenos.

15 Ciertas realizaciones de la descripción se refieren a la disminución del riesgo de la enfermedad del huésped frente al injerto, lo que conduce al rechazo del injerto de tejido por parte del receptor. El tratamiento puede realizarse para prevenir o reducir el efecto de una respuesta de rechazo hiperaguda, aguda o crónica. El tratamiento se inicia de manera preferencial con suficiente antelación al trasplante, de modo que la tolerancia será la apropiada cuando se instale el injerto; pero cuando esto no sea posible, el tratamiento puede iniciarse simultáneamente o después del trasplante. Independientemente del momento de inicio, el tratamiento generalmente continuará a intervalos regulares durante al menos el primer mes después del trasplante. Es posible que no se requieran dosis de seguimiento si se realiza una acomodación suficiente del injerto, pero se pueden reanudar si hay evidencias de rechazo o inflamación del injerto. Por supuesto, los procedimientos de tolerancia de esta invención se pueden combinar con otras formas de inmunosupresión para lograr un nivel de riesgo aún menor.

25 En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención (por ejemplo, un vehículo de PLG acoplado a una molécula antigénica) encuentran uso con uno o más soportes, matrices y/o sistemas de administración (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. 2009/0238879; patente de EE.UU. N° 7.846.466; patente de EE.UU. No. 7.427.602; patente de EE.UU. N° 7.029.697; patente de EE.UU. N° 6.890.556; patente de EE.UU. N° 6.797.738; patente de EE.UU. N° 6.281.256; incorporados en el presente documento por referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, las partículas (por ejemplo, partículas de PLG acopladas con antígeno) se asocian, se adsorben, se incrustan, se conjugan, etc. con una estructura, una matriz y/o un sistema de liberación (por ejemplo, para la liberación de material químico/biológico, células, tejidos y/o un órgano para un sujeto). En algunas realizaciones, una estructura, matriz y/o sistema de liberación (por ejemplo, para la liberación de material químico/biológico, células, tejido y/o un órgano a un sujeto) comprende y/o está hecho de materiales descritos en el presente documento (por ejemplo, PLG conjugado a uno o más péptidos antigénicos).

35 En algunas realizaciones, se proporcionan estructuras microporosas (por ejemplo, para trasplantar material biológico (por ejemplo, células, tejido, etc.) a un sujeto). En algunas realizaciones, se proporcionan estructuras microporosas que tienen agentes adheridos (por ejemplo, proteínas de la matriz extracelular, exendina-4) y material biológico (por ejemplo, células de islotes pancreáticos). En algunas realizaciones, las estructuras se utilizan en el tratamiento de enfermedades (por ejemplo, diabetes tipo 1) y métodos relacionados (por ejemplo, métodos de diagnóstico, métodos de investigación, detección de fármacos). En algunas realizaciones, se proporcionan estructuras con los vehículos conjugados al antígeno descritos en este documento y/o dentro de la estructura. En algunas realizaciones, las estructuras se producen a partir de materiales conjugados con antígeno (por ejemplo, PLG conjugado con antígeno).

45 En algunas realizaciones, la estructura y/o el sistema de administración comprende una o más capas y/o tiene una o más entidades/agentes químicos y/o biológicos (por ejemplo, proteínas, partículas conjugadas con péptidos, moléculas pequeñas, células, tejidos, etc.), véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. 2009/0238879; incorporada en este documento como referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, las partículas acopladas a antígeno se coadministran con un sistema de liberación de la estructura para provocar la inducción de una tolerancia inmunológica en la estructura y los materiales asociados. En algunas realizaciones, la estructura microporosa se administra a un sujeto con las partículas descritas en el presente documento o dentro de la estructura. En algunas realizaciones, las partículas acopladas al antígeno son acopladas a un sistema de liberación de la estructura. En algunas realizaciones, el sistema de liberación de la estructura comprende partículas acopladas al antígeno.

## Ejemplos

### Materiales y métodos

55 Generación de ratones quiméricos

Fueron sometidos a irradiación con una dosis de 950 rads ratones B6.SJL-Ptprc<sup>a</sup>Pep3<sup>b</sup>/BoyJ (CD45.1) de seis a ocho semanas de edad. Doce horas más tarde, los ratones se reconstituyeron con 10<sup>7</sup> células de médula ósea de donantes C57BL/6-7.2fms-EGFP. Los ratones recibieron sulfametoxazol (Sigma Aldrich) y trimetoprim (Sigma

Aldrich) en el agua de bebida durante 10 días después de la irradiación. Los ratones se infectaron con WNV seis semanas después de la irradiación, como se describe anteriormente. El quimerismo se comprobó mediante citometría de flujo y se encontró invariablemente que era 96-99% de origen del donante como se ha demostrado previamente (Getts et al., J. Neurochem. 103: 1019, 2007).

5 Inmunohistología

Los ratones se anestesiaron y se perfundieron con 50 ml de PBS estéril. Con la excepción del corazón, que se procesó en bloques de parafina (Getts et al., J. Neurochem 103: 10919-1030, 2007), todos los órganos se aislaron y se congelaron instantáneamente en Compuesto de Temperatura de Corte Óptima (OCT; Tissue-Tek, Tokio, Japón). Se cortaron secciones de tejido de ocho micras en un microtomo de criostato, se secaron al aire durante la noche y luego se almacenaron a -80°C hasta que fueron requeridas. Las secciones congeladas se descongelaron y se realizó una histología (tinción con hematoxilina estándar y eosina) o inmunohistoquímica (Getts et al., J. Exp Med 205: 2319-2337, 2008). Se utilizaron los anticuerpos contra MARCO, SIGN-R1 y SIGLEC-1 (R&D Systems, MN, USA), CD68 (Abcam, MA, USA) y Ki67 (Abcam), según se indica. Las imágenes se adquirieron en un microscopio Olympus BX-51 utilizando una cámara DP-70 y un software DP manager 2.2.1 (Olympus, Tokio, Japón).

15 Microscopio y toma de imágenes

Las imágenes se tomaron en un microscopio Olympus BX-51 (Olympus, Japón) utilizando una cámara DP-70 y un software DP manager 2.2.1 (Olympus).

Aislamiento de leucocitos del cerebro e hígado

Como se ha descrito anteriormente (Getts et al, J Exp Med. 29: 2319, 2007), se obtuvieron leucocitos de cerebros de ratones perfundidos con PBS mediante digestión de los cerebros durante 60 minutos a 37°C en PBS con desoxirribonucleasa (0,005 g/ml; Sigma Aldrich) y colagenasa IV (0,05 g/ml; Sigma Aldrich). La digestión se detuvo con FCS al 10% y el homogeneizado se pasó a través de un colador de células de nailon de 70 µm (Becton Dickinson, NJ, EE. UU.). El sedimento, obtenido después de una centrifugación de 10 minutos a 340xg, se resuspendió en un 30% de Percoll (Amersham, Noruega) y se colocó en capas sobre un 80% de Percoll. Los leucocitos se recogieron de la interfaz 30%/80% después de la centrifugación a 1140xg durante 25 minutos a temperatura ambiente. El mismo protocolo también se usa para derivar leucocitos del hígado, siendo el tejido pesado antes del procesamiento.

Aislamiento de leucocitos del bazo, la sangre y la médula ósea

Para el análisis de citometría de flujo, se diseccionó el fémur derecho y se eliminaron las células de la médula ósea con jeringas cargadas con PBS. Para el aislamiento del precursor de médula ósea, se utilizaron fémures y tibias de al menos 4 ratones. La suspensión celular conseguida después del lavado se filtró a través de un filtro de células de 70 µm y se centrifugó durante 5 minutos a 340g. Los glóbulos rojos en el sedimento resultante se lisaron en un tampón de lisis de glóbulos rojos a base de NH<sub>4</sub>Cl (BD Pharm Lyse™; BD Pharmingen) antes de la centrifugación durante 5 minutos a 340xg. En el caso de la sangre periférica, la sangre se recogió mediante punción cardíaca y se transfirió inmediatamente a tampón de citrato (mMol, Sigma Aldrich). La suspensión resultante se colocó en capas sobre Percoll al 70% y se centrifugó a 1140 xg durante 20 minutos a temperatura ambiente con el freno quitado. La interfaz se recogió y las células se lavaron una vez en PBS, se centrifugaron a 340xg. Para el aislamiento de los leucocitos esplénicos, los bazo se pasaron a través de un filtro de células de 7070 µg y se centrifugaron durante 5 minutos a 340g. Los glóbulos rojos en el sedimento resultante se lisaron en un tampón de lisis de glóbulos rojos a base de NH<sub>4</sub>Cl (BD Pharm Lyse™; BD Pharmingen), antes de la centrifugación durante 5 minutos a 340xg.

40 Citometría de flujo

Las células recolectadas (como se describió anteriormente) del cerebro, hígado, sangre y médula ósea se lavaron en PBS y se bloquearon con anticuerpo anti-CD16/CD32 (Biolegend). Las células viables se contaron utilizando exclusión de azul de tripano, que de forma rutinaria mostró > 95% de viabilidad celular.

Se midió la expresión de la molécula de la superficie celular y se realizaron clasificaciones celulares en un ARIA FACS (Becton Dickinson), equipado con un láser de ión argón y HeNe. Las poblaciones viables se clasificaron mediante dispersión hacia delante y lateral, y se identificaron las poblaciones fluorescentes determinadas a partir de la apertura del portal delantero. La clasificación se llevó a cabo utilizando parámetros específicos de fluorescencia y dispersión que identificaron la población de interés. La clasificación de las restricciones se estableció con respecto a la pureza para que se lograra una pureza de > 98% para las poblaciones de médula ósea.

50 Los archivos de datos FACS adquiridos se analizaron mediante el programa de citometría de flujo Flow Jo (FlowJo, Ashland, OR, EE. UU.). La cuantificación de las poblaciones celulares de interés se calculó en función de los porcentajes de citometría de flujo en el análisis y los recuentos de células absolutos de cada órgano.

Transferencia adoptiva

Se llevaron a cabo experimentos durante el desarrollo de realizaciones de la presente invención para investigar un segundo modelo de enfermedad activa denominada transferencia adoptiva. En lugar de inmunizar a los animales con el péptido, los linfocitos del bazo de ratones con enfermedad activa se transfirieron a un receptor, que posteriormente desarrollaría la enfermedad. Se llevaron a cabo experimentos durante el desarrollo de realizaciones de la presente invención para caracterizar la capacidad de las nanopartículas de PLG para desactivar las células efectoras activadas transferidas de forma adoptiva. Los ratones tratados con partículas o esplenocitos junto con un péptido de control tuvieron un aumento en la puntuación clínica a partir del día 4. Los ratones tratados con partículas de PLG-PLP<sub>139-151</sub> el día 2 tuvieron una puntuación clínica media de 0 para todos menos dos puntos de tiempo hasta el día 40, y la puntuación clínica media para esos otros puntos de tiempo fue de 0,25.

10 ELISA multiplexado

Se realizaron ELISA de placa multiplexada según las instrucciones del fabricante (Quansys Biosciences, Logan, Utah, EE. UU.). Brevemente, se homogeneizaron en PBS cerebro, bazo y tejido hepático, se aclararon con una centrifugación 1000 xg y se almacenaron a -20°C hasta realizar el ensayo. También se utilizaron muestras de suero. Las muestras descongeladas y los estándares se diluyeron en el tampón provisto, y se colocaron en una placa de 30 µl de cada pocillo con 16 puntos, cada uno de los cuales contenía un anticuerpo de captura para una proteína soluble particular. Las placas se incubaron luego durante 1 hora en un agitador orbital a 120 r.p.m. Las placas se lavaron 3 veces y se agregaron 30 µl de anticuerpo de detección a cada pocillo y se incubaron durante otra hora. Después de lavar 3 veces, se añadió estreptavidina-HRP y se incubó durante 15 minutos más. Las placas se lavaron 6 veces y se añadió la mezcla de sustrato. Las placas se leyeron inmediatamente en un reproductor de imágenes CCD (Kodak, Rochester NY, EE. UU.). Las imágenes de las placas se analizaron utilizando el software Quansys Q-view (Quansys Biosciences).

Inducción y evaluación de la encefalitis autoinmune experimental (EAE)

Se inyectó subcutáneamente a ratones una emulsión que contenía 0,1 mg de péptido MOG (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK (SEC ID N°: 1); Auspep, Parkville, Victoria, Australia; >95% HPLC purificado) y adyuvante completo de Freund con 2 mg/ml de Mycobacterium tuberculosis (Sigma Aldrich). Dos días después, a los ratones se les administraron 500 µl de toxina pertussis (Sigma Aldrich) i.p. Los ratones se controlaron para determinar la progresión de la enfermedad y se clasificaron en la siguiente escala: 1, cola floja y/o debilidad de 1 extremidad posterior; 2, debilidad en más de una extremidad, alteración de la marcha; 3, parálisis en 1 extremidad; 4, parálisis en más de una extremidad, incontinencia; 5, moribundo.

30 Estadísticas

Se realizaron los gráficos y el análisis estadístico computarizado se hizo en GraphPad Prism e InStat, respectivamente (ambos programas del software GraphPad, San Diego, CA, USA). Dependiendo de los datos, se realizó una prueba t de Student no pareada de dos colas o una prueba ANOVA de una vía con una prueba posterior de Tukey-Kramer, con una p <0,05 considerada significativa.

35 Para el análisis de correlación entre parámetros como pérdida de peso, infiltración y título del virus, se utilizó una regresión no lineal (ajuste de curva) con un polinomio de segundo orden ( $Y = A + B * X + C * X^2$ ).

Ejemplo 1

Preparación de partículas modificadoras inmunitarias cargadas negativamente (IMPs)

40 A una solución de poli(etileno-anhídrido maleico) (PEMA) en D<sub>2</sub>O (4 ml, 1% p/v) se añadió gota a gota una solución de poli(lactida-co-ácido glicólico) (PLG) en diclorometano (DCM) (2 ml, 20% p/v). La mezcla se dejó sonicar en hielo a 16 vatios durante 30 segundos utilizando el procesador ultrasónico VC 30. El producto bruto homogeneizado resultante se vertió luego en una solución de D<sub>2</sub>O (200 ml que contenía 0,5% p/v de PEMA). La suspensión homogenizada se dejó agitar durante la noche a una velocidad de 3,5 con un agitador magnético Bellco Glass, Inc., Bellstir Multi stir 9 (10 W durante 10 s, 16 W durante 10 s, 16 W durante 30 s).

45 Resultados

Después de tres horas de agitación, se realizaron análisis de tamaño de partícula usando dispersión de luz dinámica en cubetas de poliestireno desechables

a. 10 W, 10 s - Z promedio = 499,9 nm - Pdl = 0,23, pico = 634,5 nm

b. 16 W, 10 s - Z promedio = 528,9 nm - Pdl = 0,227, pico = 657,5 nm

50 c. 16 W, 30 s - Z promedio = 471,6 nm - Pdl = 0,228, pico = 580,5 nm

d. 16 W, 60 s - Z promedio = 491,1 nm - Pdl = 0,275, Pico = 600,8 nm

Después de que se completó la reacción, la suspensión bruta resultante se purificó.

Purificación

5 El tampón de bicarbonato de sodio 10x y D<sub>2</sub>O recién preparado se enfrió durante la noche a 4°C. Usando un filtro de células de 40 µm, se filtraron 36 ml de suspensión de partículas de cada lote en un tubo de centrifuga de 50 ml debidamente etiquetado que contenía 4 ml de tampón de bicarbonato de sodio 10x enfriado. Cada vaso produjo aproximadamente 6 tubos de este tipo. Todos los tubos se centrifugaron durante aproximadamente 15 minutos a 7000 g a 4°C y se aspiró el sobrenadante. La preparación de la suspensión se repitió usando el procedimiento mencionado anteriormente y gran parte de los gránulos de partículas se suspendieron en la medida de lo posible en 1 ml de D<sub>2</sub>O enfriado.

10 Las partículas resuspendidas se transfirieron a un tubo nuevo con 4 ml de tampón de bicarbonato de sodio 10x enfriado. (Paso 1)

Se repitió la resuspensión de la partícula hasta que todos los sedimentos de partículas se resuspendieron con éxito. (Paso 2)

Los 6 tubos centrifugos se combinaron luego en un tubo de centrifuga (tubo de 50 ml) y el tubo se llenó con el volumen restante hasta 40 ml de D<sub>2</sub>O enfriado (lavado 1).

15 El tubo se centrifugó durante 20 minutos a 7000 g a 4°C y se aspiró el sobrenadante.

Las etapas 1 y 2 y el lavado 1 de la partícula resultante se repitieron cada vez al menos dos veces más. Finalmente, los gránulos de partículas resultantes se sometieron luego a congelación instantánea en nitrógeno líquido y se liofilizaron hasta secarlos en el colector para obtener IMPs negativos.

20 La Figura 1 muestra la caracterización de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie mediante análisis de dispersión dinámica de la luz. Las partículas de poli(lactida co-glicólido) funcionalizadas en la superficie se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) a una tasa de conteo de 2,5 x 10<sup>5</sup> conteos por segundo en 18,2 MΩ de agua. La población de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie tenía un diámetro Z promedio de 567 nm, un diámetro máximo de 670 nm y un índice de polidispersidad de 0,209.

25 La Tabla 1 muestra las medidas para partículas de PLG-PEMA funcionalizadas en la superficie.

Los datos en la tabla son representativos, ya que cada lote es ligeramente diferente. Sin embargo, los números en la tabla se basaron en la combinación de varios lotes de partículas. Las medidas para las partículas de doble emulsión son similares a las de la Tabla 1.

Tabla 1 - Mediciones para las partículas de PLG-PEMA funcionalizadas en la superficie

Partícula	Tamaño medio de Z por intensidad (nm)	ζ-potencial (mV)
PLG (Phosphorex)	624,3	-32,7 ± 4,71
PLG-PEMA	429,9	-67,4 ± 10,9

30 Ejemplo 2

La administración de perlas de PLGA acopladas a antígenos previene la encefalitis autoinmune experimental recurrente

35 Se investigaron nanopartículas de PLG con la proteína proteolípida inmunodominante epítipo PLP<sub>139-151</sub> (PLG-PLP<sub>139-151</sub>) para inducir la tolerancia en la prevención de la encefalitis autoinmune experimental recidivante (R-EAE). Se generaron ratones R-EAE como se ha descrito anteriormente.

40 Los péptidos administrados a los animales se acoplaron a partículas con un diámetro medio de 500 nm. Los ratones se trataron con PLP<sub>139-151</sub>-PLGA (N = 5), OVA<sub>323-339</sub>-PLGA (N = 5), o PLGA no conjugado (N = 5) el día -7 en relación con el momento de la inmunización (día 0). La enfermedad máxima se observó típicamente alrededor del día 12 a 14, y los ratones se clasificaron según su enfermedad clínica. Las partículas sin péptido o modificadas con el péptido de control OVA<sub>323-339</sub> no impidieron la inducción de la enfermedad. Sin embargo, las partículas de PLGA modificadas con PLP<sub>139-151</sub> produjeron una puntuación clínica de 0 (sin enfermedad), excepto aquellas puntuaciones clínicas bajas de menos de 1 mostradas entre los días 20 y 30 (Figura 2). Los estudios previos con PLG no modificado o con partículas de poliestireno no produjeron esta reducción efectiva de la enfermedad, ya que las partículas unidas a poliestireno comúnmente provocan anafilaxis.

45 Además, se demostró que la inactivación específica de las células T CD4<sup>+</sup> específicas de la mielina por la falta de hipersensibilidad (DTH) de tipo retardado es sensible a ambos epítipos PLP<sub>139-151</sub> inmunizantes. En conjunto, el

tratamiento profiláctico con PLG- PLP<sub>139-151</sub> en el día 7 previno específicamente el desarrollo de EAE, y representa una mejora en la capacidad de las partículas para prevenir la enfermedad. Las puntuaciones producidas con las partículas son tan buenas, y quizás mejores, que las puntuaciones producidas con esplenocitos acoplados a antígenos.

- 5 El tipo de partícula administrada también tiene un efecto en el desarrollo de la EAE en el modelo de ratón. Los ratones se trataron con OVA<sub>323-339</sub>-PLS (N = 5), OVA<sub>323-339</sub> PLG<sub>APHOSPOREX</sub> (N = 5), OVA<sub>323-339</sub>-PLG<sub>APHEMA</sub> (N = 5), PLP<sub>139-151</sub>-PLA (N = 5), PLP<sub>139-151</sub>-PLG<sub>APHOSPOREX</sub> (N = 5) o PLP<sub>139-151</sub>-PLG<sub>PEMA</sub> (N = 5) el día -7 en relación con el tiempo de inmunización (día 0). La enfermedad máxima se observó típicamente alrededor del día 12 a 14, y los ratones se clasificaron según la enfermedad clínica. Las partículas de cualquier composición que se modificaron con el péptido de control OVA<sub>323-339</sub> no impidieron la inducción de la enfermedad. Sin embargo, las perlas de PLG acopladas a PLP<sub>139-151</sub> fueron más efectivas en la inducción de la regulación a la baja de R-EAE que el pLG acoplado a PLP<sub>139-151</sub> comercial (Phosphorex) o poliestireno (Figuras 3A y 3B).

#### Ejemplo 3

- 15 La infusión intravenosa de partículas de PLG acopladas con antígeno no induce una caída de la temperatura inducida por anafilaxis en animales presensibilizados con OVA/alumbre

Debido a la presencia de enfermedad activa, la anafilaxia frente a antígenos es una preocupación que podría causar una mortalidad inmediata y ha sido descrita con partículas unidas a poliestireno. La anafilaxia se asocia con una disminución significativa de la temperatura corporal. Para probar si la administración intravenosa de OVA-PLG induce una caída de la temperatura inducida por la anafilaxis en animales presensibilizados, los ratones se inmunizaron en el día 0 con 10 µg de OVA/alumbre mediante inyección intraperitoneal. En el día 14, los ratones se inmunizaron nuevamente con 10 µg de OVA/alumbre mediante inyección intraperitoneal y luego se les indujo tolerancia con OVA-PLG administrado por vía intravenosa el día 21. El día 28, a los ratones les fue inducida tolerancia con partículas de OVA-PLG u OVA mediante administración intravenosa.

- 20 Como se muestra en la Figura 4, los ratones tratados con OVA soluble en el día 28 mostraron una disminución de la temperatura en comparación con los animales tratados con las partículas OVA-PLG. No se observó ninguna disminución de la temperatura corporal en 1 hora después de la administración de las partículas.

La Figura 5 muestra que la administración de PLP-PLG durante la remisión no produjo ninguna mortalidad asociada a la anafilaxia. Se indujo EAE en ratones SJL/J hembra de seis a ocho semanas de edad mediante inyección subcutánea de PLP<sub>139-151</sub> en CFA, y se monitorizó y registró el desarrollo de la enfermedad clínica (Figura 5B). El día 21 en relación con la inducción de la enfermedad, a los ratones se les administraron inyecciones iv de PLP<sub>139-151</sub> soluble (cuadrados claros), OVA<sub>323-339</sub> soluble (círculos claros), o los mismos péptidos acoplados a las nanopartículas de PLG (oscuros). La temperatura de los animales se monitorizó y registró cada 10 minutos durante 1 hora después de la inyección (Figura 5A).

#### Ejemplo 4

- 35 El tratamiento profiláctico con partículas de PLP-PLG induce tolerancia específica a antígeno a largo plazo

La dosis óptima se determinó mediante la administración intravenosa de concentraciones crecientes de PLP<sub>139-151</sub>-PLG siete días antes de la inducción de la enfermedad, y se monitorizó el desarrollo de la enfermedad clínica en comparación con ratones SJL/J tratados con OVA<sub>323-339</sub>-PLG (Figura 6A). Se inyectaron iv nanopartículas de PLG acopladas a PLP<sub>139-151</sub> (cuadrado) u OVA<sub>323-339</sub> (círculo) a ratones SJL/J hembra de seis a ocho semanas de edad. La EAE se indujo mediante inyección subcutánea de PLP<sub>139-151</sub> en CFA 7 días (Figura 6B), 25 días (Figura 6C) o 50 días (Figura 6D) más tarde. Los animales del panel B fueron seguidos según evolucionaba la enfermedad clínica durante 100 días. La Figura 6E muestra que el día 8, en relación con la inducción de la enfermedad, se produjo una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) en el subconjunto de los ratones que se muestran en el panel B. Los animales representativos seleccionados de los grupos cebados con PLP<sub>139-151</sub>/CFA en el panel B (OVA<sub>323-339</sub>-PLG y PLP<sub>139-151</sub>-PLG) se sometieron a un tratamiento auditivo con el epítipo PLP<sub>139-151</sub> cebador y el péptido control OVA<sub>323-339</sub>. La hinchazón de la oreja como medida de la DTH se determinó 24 h más tarde y se restaron las respuestas antes de la estimulación antigénica. La Figura 6F muestra que se inyectaron por vía intravenosa ratones SJL/J hembra de seis a ocho semanas de edad con nanopartículas PLG acopladas a PLP<sub>178-191</sub> (triángulo), OVA<sub>323-339</sub> (círculo), o PLP<sub>139-151</sub> (cuadrado), o con partículas no acopladas solas (círculo delineado). La EAE se indujo 7 días después mediante inyección subcutánea de PLP<sub>178-191</sub> en CFA, y la enfermedad se monitorizó en los puntos temporales mostrados.

#### Ejemplo 5

Tratamiento de la encefalitis autoinmune experimental recidivante con partículas acopladas a antígeno

- 55 Se realizaron experimentos durante el desarrollo de las realizaciones de la presente invención para investigar la capacidad de las partículas PLG-PLP<sub>139-151</sub> para tratar la enfermedad en lugar de prevenir la enfermedad, y para determinar si la vía de administración afectaba al desarrollo de la enfermedad. Los ratones se inmunizaron el día 0

5 con PLP<sub>139-151</sub> y un adyuvante. Los ratones normalmente tienen unas puntuaciones clínicas máximas los días 12-14. En este modelo, los ratones se trataron el día 10 con las partículas PLG-PLP<sub>139-151</sub> o con las partículas de control PLG-OVA<sub>323-339</sub>, por administración intravenosa (iv), administración intraperitoneal (ip), administración subcutánea (sc), u oral. Como se muestra en la Figura 7, la tolerancia profiláctica es más eficiente cuando las partículas de PLG-PLP<sub>139-151</sub> se administraban por vía intravenosa o intraperitoneal. Los animales tratados con PLP<sub>139-151</sub>-PLG por vía intravenosa no desarrollaron la enfermedad y tuvieron puntuaciones clínicas medias de 0 en la mayoría de los puntos temporales. Esto contrastaba con los animales tratados con partículas de poliestireno PLP<sub>139-151</sub>, de modo que se observó que > 70% de los animales morían de anafilaxia.

Ejemplo 6

10 La tolerancia frente a partículas acopladas a antígeno inhibe la inducción de las respuestas Th1 y Th17 específicas del antígeno en la encefalitis autoinmune experimental recurrente activa

15 Para determinar si la administración de partículas acopladas al antígeno inhibía la inducción de células T auxiliares, se administraron por vía intravenosa partículas de MOG<sub>35-55</sub> u OVA<sub>323-339</sub>-PLG a ratones BALB/c el Día -7. El día 0, se administraron por vía subcutánea a los ratones partículas OVA<sub>323-339</sub>-PLG y adyuvante completo de Freund (CFA). Los animales se volvieron a estimular con partículas de MOG<sub>35-55</sub>-PLG u OVA<sub>323-339</sub>-PLG el día 10 y se aislaron las células de los ganglios linfáticos drenantes. El CPM y los niveles de IL-17, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-4 se midieron el día 10. Como se muestra en la Figura 8, la administración de partículas de OVA<sub>323-339</sub>-PLG inhibía las respuestas Th1 y Th17 en los animales tratados.

Ejemplo 7

20 La tolerancia es inducida por partículas de PLGA acopladas a PLP<sub>139-151</sub>

25 Se realizó una estrategia de tolerancia terapéutica adicional mediante la administración de PLP<sub>139-151</sub> PLG o OVA<sub>323-339</sub> PLG a ratones. El análisis histológico mostró que la administración de las partículas PLP<sub>139-151</sub>-PLG inhibía la inflamación de la médula espinal cervical y la desmielinización. Los ratones se trataron con PLP-PLG u OVA<sub>323-339</sub>-PLG y el tejido se recuperó el día 40. La médula espinal cervical se aisló y se cortó para investigar la respuesta inmune dentro del SNC, que es la base de la patología de la R-EAE y la esclerosis múltiple. La Figura 9 muestra una reducción de la infiltración de células inmunes dentro de la médula espinal de animales tratados con PLP<sub>139-151</sub> PLG que era más parecida al tejido nativo que al tejido de los animales tratados con OVA<sub>323-339</sub>-PLG. Los animales tratados con OVA<sub>323-339</sub>-PLG mostraron una tinción positiva para CD45, CD4 y CD11b; mientras que los animales tratados con PLP<sub>139-151</sub>-PLG tuvieron una tinción mínima para estos factores.

30 La administración de partículas PLP<sub>139-151</sub>-PLG también inhibe el bloqueo de la barrera hematoencefálica (BBB) y la activación de macrófagos en la médula espinal de ratones tratados. Los animales se trataron con adyuvante completo de Freund (CFA), partículas de PLG OVA<sub>323-339</sub> o partículas de PLG PLP<sub>139-151</sub>. Se determinaron las puntuaciones clínicas y el porcentaje de incidencia de EAE (Figura 10B) y se observaron las médulas espinales mediante imágenes in vivo (Figuras 10A y 11). Angiosense mide el derrame vascular en el SNC y Prosense muestra los macrófagos activados (la activación de la cathepsina divide al indicador y muestra una señal fluorescente). Los gráficos de barras proporcionan los números indicativos frente a la intensidad de la señal que se muestra en las exploraciones de cerebro y SC.

40 La tolerancia también puede ser inducida por partículas en las que el antígeno ha sido encapsulado. La Figura 12 muestra que la administración de partículas de PLG en las que se ha encapsulado PLP<sub>139-151</sub> inhibe la inducción de R-EAE en ratones. La capacidad de encapsular autoantígenos permite el uso de mezclas complejas de proteínas o incluso de homogenizados de órganos para lograr una mayor cobertura de antígenos y, por lo tanto, tratar más eficazmente la propagación de epítomos.

Ejemplo 8

45 La tolerancia inducida por las partículas de PLGA acopladas a PLP<sub>139-151</sub> depende parcialmente de la expansión/activación de las células T reguladoras

50 Se trataron ratones SJL/J con un anticuerpo anti-CD25, un marcador común para células T reguladoras (Tregs) el día -9, y luego el día -7 se trataron con partículas de PLG OVA<sub>323-339</sub> y un anticuerpo anti-CD25, partículas de PLG OVA<sub>323-339</sub> y un anticuerpo IgG de control, partículas PLP<sub>139-151</sub>-PLG y un anticuerpo anti-CD25, o partículas PLP<sub>139-151</sub>-PLG y un anticuerpo IgG de control. Como se muestra en la Figura 13, los animales tratados con las partículas PLP<sub>139-151</sub>-PLG y el anticuerpo anti-CD25 mostraron, a veces, una puntuación clínica media mayor que los animales tratados con partículas PLP<sub>139-151</sub>-PLG y un anticuerpo IgG de control. Esto confirma que las Treg o al menos las células T que expresan CD25 desempeñan un papel en el inicio de la tolerancia.

Ejemplo 9

La tolerancia terapéutica es inducida por las partículas PLP<sub>139-151</sub>-PLG en la EAE activa y adoptiva

La tolerancia terapéutica inducida por las partículas PLP<sub>139-151</sub>-PLG se comparó en la EAE activa y adoptiva. La EAE adoptiva se indujo en ratones SJL/J hembras de seis a ocho semanas de edad mediante transferencia adoptiva de  $2,5 \times 10^6$  blastos activados con PLP<sub>139-151</sub>. Los ratones fueron inyectados iv con péptido PLP<sub>139-151</sub> (cuadrados) u OVA<sub>323-339</sub> (círculos) acoplado a nanopartículas de PLG de 500 nm 2 días (Figura 14A) o 14 días (Figura 14C) después de la inducción de la enfermedad. Las puntuaciones de la enfermedad clínica se compararon con las que siguieron al tratamiento con esplenocitos acoplados a antígenos (Figura 14A).

Se recuperaron el cerebro y la médula espinal de ratones tolerados con PLP<sub>139-151</sub> o OVA<sub>323-339</sub> para su análisis histológico el día 42. Las secciones de los ratones del panel A se tiñeron para determinar la proteína PLP y CD45 (Figura 14B). Las secciones de la médula espinal de ratones del panel C se tiñeron con Luxol Fast Blue (Figura 14D). Las áreas de desmielinización e infiltración celular son indicadas por flechas. Los resultados muestran que las partículas PLP<sub>139-151</sub>-PLG inducen tolerancia en ratones con EAE adoptiva.

La Figura 15 muestra gráficos que representan las puntuaciones clínicas medias de los ratones con EAE activa y EAE adoptiva después del tratamiento con partículas SP o PLG conjugadas con OVA<sub>323-339</sub> o PLP<sub>139-151</sub>. Los ratones fueron inyectados iv con péptido PLP<sub>139-151</sub>-SP, PLP<sub>139-151</sub>-PLG, u OVA<sub>323-339</sub>-SP, u OVA<sub>323-339</sub>-PLG acoplado a nanopartículas de 500 nm 10 días (Figura 15A) o 2 días (Figura 15B) después de la inducción de la enfermedad y se determinó la puntuación clínica media. En ambos casos, la administración de partículas PLP<sub>139-151</sub>-PLG palió la enfermedad, lo que indica una inducción de la tolerancia.

La infiltración de las células inmunes del sistema nervioso central también se reduce drásticamente en ratones tolerados con PLP-PLG. Se les inyectó i.v. a ratones SJL/J nanopartículas de PLG de 500 nm acopladas con PLP<sub>139-151</sub> (cuadrados) u OVA<sub>323-339</sub> (círculos) 2 días después de la inducción de EAE por transferencia adoptiva. En el máximo de la enfermedad (día 14), se extrajeron los cerebros y la médula espinal y se contaron por citometría de flujo el número de linfocitos (Figura 16B), APC (Figura 16C), células de la microglía (Figura 16D), células dendríticas periféricas (Figura 16E), las células dendríticas mieloides (Figura 16F) y los macrófagos (Figura 16G). La estrategia de activación de estas poblaciones se describe en la Figura 16A. Las preparaciones de células del SNC se estimularon con PMA e ionomicina durante 5 h antes de la tinción intracelular para IL-17A e IFN- $\gamma$  (Figura 16H).

#### Ejemplo 10

El tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 anula la inducción de la tolerancia con nanopartículas de PLG que encapsulan PLP<sub>139-151</sub> en la transferencia de adopción EAE

Para probar el efecto del tratamiento con un anticuerpo anti-PD-1 en la tolerancia inducida por PLP<sub>139-151</sub> en ratones con EAE adoptiva, el Día 0, los ratones recibieron  $3 \times 10^6$  blastos de células T activadas con PLP<sub>139-151</sub> mediante administración intravenosa. El día 2, recibieron PLP<sub>139-151</sub> u OVA<sub>323-339</sub> encapsulado en partículas de PLG mediante administración intravenosa con PBS o un anticuerpo anti-PD-1. Los días 4, 6, 8, 10 y 12, todos los animales recibieron 250  $\mu$ g de anticuerpo anti-PD-1 o PBS.

Como se muestra en la Figura 17, la administración del péptido PLP<sub>139-151</sub> encapsulado en una partícula PLG induce tolerancia cuando la partícula se administra con PBS. Sin embargo, la administración del anticuerpo anti-PD-1 disminuye esta tolerancia.

#### Ejemplo 11

El tratamiento con un anticuerpo monoclonal agonista anti-CD40 anula la inducción de la tolerancia con nanopartículas de PLG que encapsulan PLP<sub>139-151</sub> en EAE de transferencia adoptiva de una manera dependiente de IL-12

Para probar el efecto del tratamiento con un anticuerpo agonista anti-CD40 en la tolerancia inducida por PLP<sub>139-151</sub> en ratones con EAE adoptiva, el día 0, los ratones recibieron  $3 \times 10^6$  blastos de células T activadas con PLP<sub>139-151</sub> mediante administración intravenosa. El día 2 los ratones recibieron PLP<sub>139-151</sub> u OVA<sub>323-339</sub> encapsulados en partículas de PLG mediante administración intravenosa. El día 3, los animales recibieron un anticuerpo de control IgG2a, un anticuerpo anti-CD40 o un anticuerpo anti-CD40 y un anticuerpo anti-IL-12.

Como se muestra en la Figura 18, la administración del péptido PLP<sub>139-151</sub> encapsulado en una partícula de PLG induce tolerancia cuando la partícula se administra con PBS. La administración del anticuerpo anti-CD40 agonista disminuye esta tolerancia, pero esta disminución de la tolerancia se revierte mediante la adición de un anticuerpo anti-IL-12.

#### Ejemplo 12

El OVA encapsulado en partículas de PLG inhibe profilácticamente la inflamación de las vías respiratorias alérgicas y las respuestas Th2 específicas de OVA in vivo

Para probar el efecto profiláctico de los OVA encapsulados en partículas de PLG en relación a la inflamación de las vías respiratorias, se trataron ratones por vía intravenosa con OVA-PLG el día 7. El día 0 los ratones recibieron

inyecciones intraperitoneales de OVA/Alum a una dosis de 10 µg/ratón. El día 7, los ratones se trataron de nuevo por vía intravenosa con OVA-PLG y recibieron otra inyección de 10 µg/ratón ip de OVA/Alum el día 14. Entre los días 28 y 30, los ratones se trataron tres veces con OVA en aerosol.

5 Como se muestra en la Figura 19, la administración profiláctica de OVA-PLG disminuía la secreción de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, y reducía los niveles de IgE de OVA en suero y de eosinófilos en el pulmón.

10 OVA encapsulado en partículas de PLG inhibe profilácticamente las respuestas de recuerdo in vitro específicas de OVA de los ganglios linfáticos mediastínicos. Como se muestra en la Figura 20A, la proliferación de ganglios linfáticos observada después de la reestimulación con 25 µg de OVA disminuye en aquellos animales tratados con OVA-PLG. Además, el tratamiento con OVA-PLG disminuye la liberación de citoquinas después de la reestimulación con OVA. La Figura 20B muestra que los niveles de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 son menores en ratones tratados con OVA-PLG.

#### Ejemplo 13

OVA encapsulado en partículas de PLG inhibe terapéuticamente la inflamación de las vías respiratorias alérgicas y las respuestas Th2 específicas de OVA in vivo

15 Para probar el efecto terapéutico de OVA encapsulado en partículas de PLG en relación con la inflamación de las vías respiratorias, los ratones se trataron por vía intraperitoneal con OVA/Alum a una dosis de 10 µg/ratón el día 0 y el día 14. Los ratones se administraron por vía intravenosa con OVA-PLG los días 28 y 42. Entre los días 56-58, los ratones se trataron tres veces con OVA en aerosol.

20 Como se muestra en la Figura 21, la administración terapéutica de OVA-PLG disminuía la secreción de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, y reducía los niveles de IgE de OVA en suero y de eosinófilos en el pulmón.

25 La Figura 22 muestra que OVA encapsulado en partículas de PLG regula a la baja las citoquinas Th2 específicas de OVA en el BAL Fluid Better que las partículas de PLG acopladas a OVA. Los animales se trataron como se describe anteriormente, excepto que en los días 28 y 42, los ratones se trataron con OVA encapsulado en partículas de PLG, u OVA acoplado a partículas de PLG. Sorprendentemente, el OVA encapsulado inhibía la secreción de citoquinas Th2 más que el péptido OVA acoplado a la superficie de la partícula de PLG.

#### Ejemplo 14

La tolerancia inducida por las partículas del péptido p31 de cromogranis A-PLG inhibe la diabetes tipo 1

30 La diabetes tipo 1 se indujo en ratones BDC2.5 aislando células de los ganglios linfáticos de bazo, axilares, braquiales, inguinales y pancreáticos de ratones a las 3 semanas. Las células aisladas se cultivaron y se activaron in vitro incubando  $2 \times 10^6$  células/ml con péptido p31 0,5 µM durante 96 horas. Se transfirieron  $5 \times 10^6$  células mediante la administración intravenosa a ratones NOD.SCID (6-8 semanas) en el Tiempo 0. Los ratones fueron tolerados mediante administración intravenosa con p31 o péptido MOG<sub>35-55</sub> acoplado a SP o PLG de 2 horas a 3 días después.

35 Las Figuras 23A y 23B muestran los niveles de glucosa en sangre en los animales después del tratamiento. La administración del péptido p31 acoplado a PLG dio como resultado niveles de glucosa en sangre más bajos en comparación con los observados después de la administración con las partículas acopladas al péptido MOG<sub>35-55</sub>.

La Figura 23C muestra que el porcentaje de células secretoras de IFN $\gamma$  observadas en los animales también se redujo en los ratones tratados con p31-PLG en comparación con los ratones tratados con péptido-PLG de MOG<sub>35-55</sub>.

40 La tolerancia inducida por p31-PLG requiere Tregs. La diabetes tipo 1 se indujo en ratones como se describió anteriormente, y 2 horas después de que las células activadas se transfirieran a los ratones NOD.SCID, a los ratones se les indujo tolerancia con partículas p31-PLG o MOG<sub>35-55</sub> PLG. Como se muestra en la Figura 24, el agotamiento de las Treg anula la tolerancia inducida por la administración de partículas p31-PLG.

#### Ejemplo 15

La tolerancia inducida por partículas de PLG acopladas a insulina inhibe el desarrollo de la diabetes tipo 1 espontánea en ratones NOD

45 Los ratones NOD se trataron con BSA (N = 22) o con partículas de PLG acopladas con insulina (N = 23) mediante la administración intravenosa a las 6, 8 y 10 semanas de edad. Los ratones fueron analizados para determinar el desarrollo de la diabetes que se definió como una concentración de glucosa en sangre > 250 mg/dL. Como se muestra en la Figura 25, la administración de partículas de PLG acopladas a insulina aumentó significativamente el porcentaje de ratones que no desarrollaban diabetes durante 300 días (69,6% en comparación con 22,7%; p = 0,0027).

#### Ejemplo 16

## Cinética del injerto

Se indujo tolerancia a ratones hembra CD45.2 con OVA-PLG o con el péptido de control Dby-PLG (el principal antígeno H-Y expresado por ratones C57BL/6 macho) el día -7. El día -1, los ratones fueron sometidos a irradiación con 200 rads y luego fueron sometidos a un trasplante con  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ , o  $1 \times 10^7$  células de médula ósea de ratones macho CD45.1 el día 0. A los ratones receptores se les indujo tolerancia luego con OVA-PLG, Dby-SP o Dby-PLG el día 1 y se extrajo su sangre para el análisis FACS del quimerismo. La Figura 26 muestra el porcentaje de células donantes CD45.1 observadas en los ratones receptores.

La Figura 27 muestra el porcentaje de células CD45.1 donadoras en los ratones receptores después de la inducción de tolerancia con OVA-PLG, Dby-SP o Dby-PLG el día 1. Un ratón de control positivo no mostró ningún injerto significativo (~ 10%). Ninguno de los ratones de control negativo injertó las células donantes. Un ratón Dby-SP no mostró ningún injerto significativo (~ 10%). Dos ratones OVA-PLG injertaron células donadoras (~ 10%): uno las rechazó completamente en la semana 16. Un ratón Dby-PLG comenzó a rechazarlas en la semana 12 y un 10% en la semana 16. El grupo Dby-PLG osciló entre el 10% y el 56% de injertos en la Semana 16. Los ratones OVA-PLG mostraron: 1) injerto espontáneo, 2) homología de secuencia entre OVA323 y Dby, o 3) propiedades tolerogénicas de las partículas. Dby-PLG permite más injertos que Dby-SP y OVA-PLG.

La Figura 28 muestra que la tolerancia en el tiempo tiene efectos en el porcentaje de células CD45.1 en los ratones receptores. Los controles positivos muestran menos injerto (~ 4%) de lo esperado (~ 10%). Un ratón de control negativo tenía un 5% de injerto. De todos los 3 grupos OVA-PLG, un ratón en el grupo Día -7, Día +1 mostró injerto (12%). La tolerancia en el día 1 es más relevante clínicamente que la tolerancia en el día -7.

## Ejemplo 17

Las partículas de cumarina-6 PLGA no son detectables 24 horas después de la administración

Los ratones se trataron con partículas de cumarina-6 PLGA que estaban acopladas a un antígeno o estaban sin antígeno. Como se muestra en la Figura 29, las partículas fueron detectables a las 3 horas posteriores a la administración, pero no a las 24 horas posteriores a la administración. Ratón naïve no inyectado (fila superior) en comparación con micropartículas de PLGA/PEMA i.v. fluorescentes inyectadas en secciones de bazo de ratón (columna izquierda), hígado (columna central) y pulmón (columna izquierda) a las 3 horas posteriores a la inyección (fila central) y a las 24 horas (fila inferior) posteriores a la inyección, contrastadas con DAPI.

## Ejemplo 18

Las nanopartículas se asocian con los macrófagos in vivo

El análisis del hígado 6 horas y 15 horas después de la administración muestra que las partículas de PLGA se localizaron juntas con las células F4/80 en el hígado (Figura 30).

Los macrófagos de la zona marginal predominantemente captaban partículas acopladas a PLP<sub>139-151</sub> marcadas con TAMRA 24 horas después de la infusión intravenosa. Como se muestra en la Figura 31, el mayor porcentaje de células PLP<sub>139-151</sub> son macrófagos de la zona marginal.

## Ejemplo 19

Inhibición de R-EAE en ratones SJL/J usando partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen PLP<sub>139-151</sub> solubles dentro de sus núcleos.

A los grupos de ratones SJL/J se les inyectó iv 2,5 mg de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie de 500 nm - 700 nm con péptido PLP<sub>139-151</sub> soluble dentro de sus núcleos el Día -7 y el Día-1 antes en relación con el cebado con PLP<sub>139-151</sub>/CFA el día 0. Los ratones de control se cebaron el día 0, pero no recibieron ningún tratamiento de partículas el día 7 o el día 1. Se observaron ratones en busca de signos clínicos de R-EAE durante 20 días más.

Los resultados representados en la Figura 32 representan la puntuación clínica media diaria frente al número de días de cebado de PLP<sub>139-151</sub>/CFA. La R-EAE inducida por PLP<sub>139-151</sub>/CFA se inhibe en ratones SJL/J mediante la inducción de la tolerancia inmunológica utilizando partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen PLP<sub>139-151</sub> soluble dentro de sus núcleos.

## Ejemplo 20

Inhibición de la inflamación de las vías respiratorias alérgicas por partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen ovalbúmina soluble

En ratones se indujo inflamación alérgica de las vías respiratorias (AIA). A grupos de ratones Balb/c se les inyectó por vía intravenosa 2,5 mg de partículas de 500 nm - 700 nm de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie con ovalbúmina soluble o albúmina de suero bovino soluble (control) dentro de sus núcleos el Día -7 y Día

+7 antes del cebado con ovalbúmina/alum los días 0 y +14. Los ratones se expusieron los días +28-30 con ovoalbúmina en aerosol. Luego se sacrificaron los ratones y se obtuvo un fluido de lavado broncoalveolar. También se midieron los niveles séricos de IgE específica de ovalbúmina.

5 Los recuentos de eosinófilos dentro del líquido de lavado broncoalveolar indican la gravedad de la ICA; los recuentos más altos indican una enfermedad peor. Los niveles séricos de IgE indican la gravedad de la ICA; los niveles más altos indican una enfermedad peor.

La Figura 33 muestra que los ratones tratados con OVA-PLG encapsulado mostraban la mayor reducción en la acumulación de eosinófilos. La Figura 34 muestra que los ratones tratados con OVA-PLG encapsulado mostraban la mayor reducción en los niveles séricos de IgE en comparación con los animales no tratados o tratados con control.

10 La inflamación alérgica inducida por ovalbúmina/alumbre en ratones Balb/c fue inhibida por la inducción de la tolerancia inmunológica utilizando partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contenían ovalbúmina soluble dentro de sus núcleos

#### Ejemplo 21

Síntesis de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que encapsulan antígeno

15 El presente ejemplo detalla la formulación y caracterización parcial de partículas de poli(lactida-co-glicólido) biodegradables que han sido funcionalizadas en la superficie con una alta densidad de grupos carboxilato y contienen antígeno soluble dentro de sus núcleos que están rodeados por una capa de poli(lactida-co-glicólido) para la inducción de tolerancia en enfermedades autoinmunes y para el tratamiento de alergias.

20 La alta densidad de los grupos carboxilato se logró mediante el uso de poli(etileno-alt-anhídrido maleico (PEMA)), un polímero con grupos carboxilato incorporado en su esqueleto, como el tensioactivo para el procedimiento de emulsificación.

25 Como se describió anteriormente, las partículas de poli(lactida-co-glicólido) biodegradables que contienen PLP<sub>139-151</sub> soluble dentro de sus núcleos y funcionalizadas en la superficie con una alta densidad de grupos carboxilato son efectivas para la inducción de la tolerancia inmunológica en el modelo murino R-EAE inducido por SJL/J PLP<sub>139-151</sub>/CFA de la esclerosis múltiple. Además, las partículas de poli(lactida-co-glicólido) biodegradables que contienen ovalbúmina soluble dentro de sus núcleos y funcionalizadas en la superficie con una alta densidad de grupos carboxilato son efectivas para la inducción de la tolerancia inmunológica en el modelo murino AAI inducido por ovoalbúmina en Balb/c de asma alérgica.

30 Partículas de poli(lactida-co-glicólido) que contienen ovalbúmina soluble o albúmina de suero bovino dentro de sus núcleos y funcionalizadas en la superficie con una alta densidad de grupos carboxilato se sintetizaron utilizando un método de evaporación de disolvente de doble emulsión como sigue:

1. Se añadieron gota a gota 150 µL de 200 mg/mL de ovalbúmina o albúmina de suero bovino en agua sin endotoxinas a 2 mL de poli(lactida-co-glicólido) al 20% p/v en diclorometano en un vial de centelleo de 20 mL.

35 2. La mezcla resultante se colocó en hielo y se sonicó durante 30 segundos a 10 vatios utilizando un sonicador de sonda.

3. Se añadieron 10 mL de poli (etileno-alt-anhídrido maleico) al 1% p/v en agua.

4. La mezcla resultante se colocó en hielo y se sonicó durante 30 segundos a 16 vatios utilizando un sonicador de sonda.

40 5. La emulsión resultante se vertió en 200 ml de poli(etileno-alt-anhídrido maleico) al 0,5% p/v en un vaso de precipitados de 600 ml y se agitó durante la noche para permitir el endurecimiento de las partículas.

6. Las partículas endurecidas se purificaron luego por centrifugación y se lavaron 3 veces con tampón bicarbonato pH 9,6.

7. Las partículas purificadas se resuspendieron en 4% p/v de sacarosa y 3% p/v de D-manitol en agua, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se liofilizaron hasta sequedad.

45 La Figura 35 muestra la caracterización de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen PLP<sub>139-151</sub> soluble dentro de sus núcleos mediante el análisis de dispersión dinámica de la luz. Las partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) a una tasa de conteo de  $1,792 \times 10^5$  conteos por segundo en 18,2 MΩ de agua. La población de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie tenía un diámetro Z promedio de 584 nm, un diámetro máximo de 679 nm y un índice de polidispersidad de 0,162. Estos resultados son representativos de 6 lotes de síntesis, siguiendo el protocolo escrito anteriormente.

50

La Figura 36 muestra la caracterización de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen PLP<sub>139-151</sub> soluble dentro de sus núcleos mediante una medición del potencial  $\zeta$ . Las partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) a una tasa de conteo de  $6,67 \times 10^4$  conteos por segundo en 18,2 M $\Omega$  de agua. La población de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie tuvo un potencial  $\zeta$  máximo de -48,9 mV y una desviación de  $\zeta$  de 5,14 mV. Estos resultados son representativos de 6 lotes de síntesis, siguiendo el protocolo escrito anteriormente.

La Figura 37 muestra la caracterización de las partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen ovoalbúmina soluble dentro de sus núcleos mediante análisis de dispersión por luz dinámica. Las partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) a una tasa de recuento de  $1,822 \times 10^5$  conteos por segundo en 18,2 M $\Omega$  de agua. La población de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie tenía un diámetro promedio de Z de 569,7 nm, un diámetro máximo de 700,3 nm y un índice de polidispersidad de 0,230. Estos resultados son representativos de 3 lotes de síntesis, siguiendo el protocolo escrito anteriormente.

La Figura 38 muestra la caracterización de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen ovoalbúmina soluble dentro de sus núcleos mediante la medición del potencial  $\zeta$ . Las partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) a una tasa de conteo de  $2,67 \times 10^4$  conteos por segundo en 18,2 M $\Omega$  de agua. La población de partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie tuvo un potencial  $\zeta$  máximo de -52,2 mV y una desviación de  $\zeta$  de 5,38 mV. Estos resultados son representativos de 3 lotes de síntesis, siguiendo el protocolo escrito anteriormente.

#### Ejemplo 22

Los liposomas funcionalizados en la superficie que contienen PLP<sub>139-151</sub> soluble dentro de sus núcleos inducen tolerancia inmunológica en el modelo R-EAE murino de la esclerosis múltiple.

Los presentes inventores también han descubierto que los vehículos de administración liposómica biodegradables que han sido funcionalizados en la superficie con una alta densidad de grupos cargados negativamente y que contienen antígeno soluble dentro de sus núcleos inducen tolerancia inmunológica en el modelo murino R-EAE de esclerosis múltiple.

Los liposomas utilizados en este estudio estaban compuestos por los siguientes lípidos en las siguientes proporciones molares: 30:30:40 fosfatidilcolina:fosfatidilglicerol:colesterol. A los grupos de ratones SJL/J se les inyectaron iv liposomas funcionalizados en la superficie de 200 nm (10  $\mu$ mol de lípidos totales por ratón) con péptido PLP<sub>139-151</sub> soluble dentro de sus núcleos el Día -7 en relación con el cebado con PLP<sub>139-151</sub>/CFA el Día 0. Los ratones de control se cebaron el día 0 y recibieron liposomas funcionalizados en la superficie de 500 nm - 700 nm (10  $\mu$ m de lípidos totales de lípidos por ratón) con péptido OVA<sub>323-339</sub> soluble en sus núcleos el Día -7. Se observaron ratones en busca de signos clínicos de R-EAE durante 17 días más.

Los resultados muestran la puntuación clínica media diaria frente al número de días de cebado de PLP<sub>139-151</sub>/CFA. Como se muestra en la Figura 39, los animales tratados con los liposomas funcionalizados en la superficie con el péptido PLP<sub>139-151</sub> soluble dentro de sus núcleos tenían una puntuación clínica más baja que aquellos tratados con los liposomas funcionalizados en la superficie que contenían el péptido OVA<sub>323-339</sub> soluble.

Los resultados de este estudio demuestran que los liposomas biodegradables que contienen PLP<sub>139-151</sub> soluble dentro de sus núcleos y funcionalizados en la superficie con alta densidad de grupos cargados negativamente son efectivos para la inducción de la tolerancia inmunológica en el modelo murino R-EAE inducido por SJL/J PLP<sub>139-151</sub>/CFA de la esclerosis múltiple.

La tolerancia inducida por las partículas acopladas a antígeno o encapsuladas con antígeno es específica de antígeno, depende de la dosis y es de larga duración (> 150 días). La tolerancia es mejor inducida por la administración intravenosa de una partícula acoplada que tiene un diámetro de entre 500 nm y 1  $\mu$ g con un potencial zeta  $\leq -5$  mV. La inducción de la tolerancia depende de la captación de las partículas por parte del receptor secuestrante MARCO con las superficies polianiónicas (por ejemplo, partículas de PS/PLG carboxiladas). La tolerancia es inducida y mantenida por una combinación de anergia (parcialmente revertida por los anticuerpos anti-PD-1 y anti-CD40) e iTregs (parcialmente revertida por los anticuerpos anti-CD25). Las partículas de la invención se acumulan predominantemente en el hígado y en los macrófagos de la zona marginal esplénica (CD11b<sup>alto</sup> CD11c<sup>bajo</sup> MARCO<sup>+</sup> Sign-R1<sup>+</sup> Siglec-1<sup>-</sup>).

Existen numerosas ventajas por usar partículas acopladas a antígenos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes en comparación con el uso de células dendríticas tolerogénicas inmaduras impulsadas por antígeno o dirigidas por antígeno o Treg específicas de antígeno modificadas. La rapidez y simplicidad de la preparación e inducción de tolerógenos utilizando un vehículo universal tolerógeno comercialmente fabricado por GMP: no hay necesidad de aislar y expandir células dendríticas inmaduras o Tregs ex vivo, no hay necesidad de preocuparse por el hecho de que las células dendríticas inmaduras se activen tras la manipulación ex vivo y se conviertan en

estimulantes en lugar de tolerogénicas o en Tregs que se convierten a Th1/17 después de la transferencia; dado que las APC de la zona marginal inmadura del huésped procesan y representan el antígeno de manera tolerogénica, las APC del huésped pueden seleccionar los auto epítomos inmunodominantes relevantes de partículas de PLG que encapsulan autoantígenos o extractos de tejidos intactos (por ejemplo, las partículas de PLG encapsuladas en OVA previenen la AAD inducida por OVA/alumbre; y el protocolo es específico de antígeno sin supresión de observadores, es seguro, altamente eficiente y puede inducir una bajada de la sensibilidad en las células T efectoras (Th1, Th2, Th17 y CD8) y las células T naïve involucradas en la propagación del epítipo.

Las partículas y liposomas biodegradables y sintéticos podrían facilitar la fabricación, la amplia disponibilidad de agentes terapéuticos y aumentar el número de posibles sitios de tratamiento. Para este fin, se han diseñado específicamente partículas biodegradables de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie con una alta densidad de grupos carboxilato de superficie, utilizando el tensioactivo poli(etileno-alt-anhídrido maleico).

También se han desarrollado liposomas funcionalizados en la superficie utilizando una proporción 30:30:40 de fosfatidilcolina:fosfatidilglicerol:colesterol.

Además, se han diseñado estas partículas para que contengan ovoalbúmina soluble dentro de sus núcleos a fin de evitar la contaminación química y los problemas de pureza que rodean la conjugación de la superficie del péptido o la proteína. Estas partículas de poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen ovoalbúmina soluble dentro de sus núcleos son efectivas para la prevención del desarrollo de la enfermedad y, por lo tanto, para la inducción de tolerancia inmunológica en el modelo murino Balb/c de asma alérgico AAI inducido por ovoalbúmina/alum. Las partículas de péptido o proteína conjugadas a poli(lactida-co-glicólido) funcionalizadas con carboxilato que usan EDC se unen de manera indiscriminada, lo que da como resultado agregados de antígenos y agregados de partículas antígeno-partículas que son difíciles de caracterizar y purificar en poblaciones homogéneas.

Se ha producido una población homogénea de partículas de poli(lactida co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contiene ovoalbúmina soluble dentro de sus núcleos y que no requieren conjugación de la superficie del antígeno.

Se ha demostrado además que los liposomas biodegradables que contienen PLP<sub>139-151</sub> soluble dentro de sus núcleos y que están funcionalizados en la superficie con una alta densidad de grupo cargados negativamente son efectivos para la inducción de la tolerancia inmunológica en el modelo murino R-EAE de la esclerosis múltiple inducido por SJL/J PLP<sub>139-151</sub>/CFA.

Los liposomas y las partículas de poli(lactida-co-glicólido) de la presente invención ofrecen numerosas ventajas. Las ventajas incluyen:

1) Las partículas biodegradables no persistirán durante largos períodos de tiempo en el cuerpo y se puede controlar el tiempo de degradación completa.

2) Las partículas y los liposomas se pueden funcionalizar para facilitar la internalización sin activación celular. Con este fin, se ha cargado fosfatidilserina en microesferas PLG.

3) Las partículas y los liposomas también pueden diseñarse para incorporar ligandos dirigidos a una población celular específica.

4) También se pueden incluir citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$  para limitar la activación del tipo de célula que está internalizando las partículas y para facilitar la inducción de tolerancia a través de la anergia y/o la eliminación y la activación de las células T reguladoras.

Esta función combinatoria de las partículas o los liposomas puede dirigirse a la inducción de la tolerancia desde múltiples perspectivas, por lo que las partículas de diseño son un avance significativo en relación con las partículas de poliestireno. Las posibles aplicaciones clínicas de esta tecnología de inducción de la tolerancia incluyen:

(1) enfermedades autoinmunes mediadas por anticuerpos y células T (como la esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, lupus sistémico, etc.): se inducirá tolerancia con partículas complejadas con los autoantígenos relevantes que dirigen la enfermedad autoinmune particular

(2) la tolerancia en alergias a alimentos y pulmonares, alergias cutáneas y asma se induciría con partículas complejadas con los alimentos específicos (por ejemplo, proteínas de maní, etc.), inyectadas (proteínas de veneno de abeja, etc.), o sustancias inhaladas (p. ej., proteínas de polen de ambrosía, proteínas del pelo de mascotas, etc.) que provocan la reacción alérgica

(3) rechazo de trasplantes: se inducirá tolerancia frente a los antígenos de trasplante en los órganos o células del donante antes del trasplante de órganos para prevenir el rechazo por el receptor

(4) terapia de reemplazo enzimático: se induciría tolerancia a las enzimas que los pacientes con deficiencias genéticas no producen para evitar que produzcan respuestas de anticuerpos neutralizantes a enzimas producidas de forma recombinante administradas para tratar su deficiencia particular.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Cour Pharmaceuticals

<120> Partículas peptídicas conjugadas

5 <130> COUR-002/01WO

<150> 61/662,687

<151> 2012-06-21

10 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

15 <211> 21

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

20 <221> PÉPTIDO

<222> (1)..(21)

<400> 1

Met	Glu	Val	Gly	Trp	Tyr	Arg	Ser	Pro	Phe	Ser	Arg	Val	Val	His	Leu
1				5					10					15	

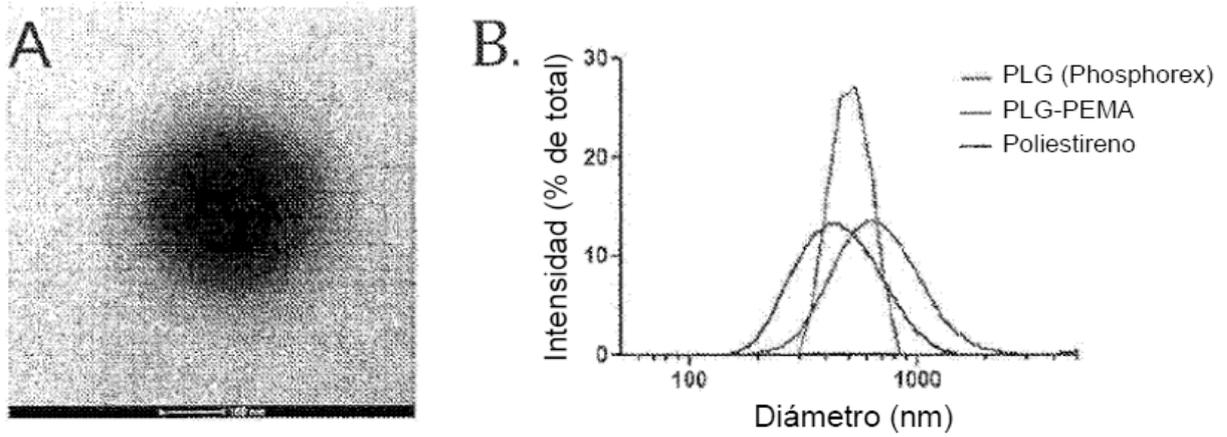
Tyr	Arg	Asn	Gly	Lys
			20	

25

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una partícula vehículo de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) funcionalizada en la superficie con carboxilato con un potencial zeta negativo que comprende un antígeno encapsulado, en donde el potencial zeta de la partícula está entre -100 mV y 0 mV, y en donde la composición induce la tolerancia de dicho antígeno.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el potencial zeta de la partícula está entre aproximadamente -50 mV y aproximadamente -40 mV.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que la partícula es un copolímero que tiene una relación molar de aproximadamente 80:20 a aproximadamente 100: 0 de ácido poliláctico:ácido poliglicólico.
- 10 4. La composición de la reivindicación 1, en la que la partícula tiene un diámetro comprendido entre aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , entre aproximadamente 0,3  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , entre aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ , entre aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , o aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$ .
- 15 5. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho antígeno comprende un antígeno autoinmune, un antígeno expresado en un tejido que se trasplanta en un sujeto, o un alérgeno.
- 20 6. La composición de la reivindicación 5, en la que dicho antígeno comprende una proteína, o al menos una porción de ésta, seleccionada del grupo que consiste en: proteína básica de mielina, receptor de acetilcolina, antígeno endógeno, glicoproteína oligodendrocítica de mielina, antígeno pancreático de células beta, insulina, ácido glutámico descarboxilasa (GAD), colágeno tipo 11, gp39 de cartílago humano, fp130-RAPS, proteína proteolípida, fibrillarina, pequeña proteína nucleolar, receptor del factor estimulante de la tiroidea, histonas, glicoproteína gp70, piruvato dehidrogenasa deshidrolipoamida acetiltransferasa (PCD-E2), antígeno del folículo piloso, A-gliadina, e isoforma 5 de tropomiosina humana, polen de la hierba de Bahía (BaGP), alérgeno de melocotón Pru p 3, alérgeno a la leche alfa 1-Caein, alérgeno para el apio Apig1, alérgeno a la nuez de Brasil Bere1, alérgeno a la leche B-lactoglobulina, albúmina de suero bovino, alérgeno de avellana Cor a 1.04 o alérgeno de huevo de ovoalbúmina.
- 25 7. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha partícula es biodegradable.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en un método para inducir tolerancia específica de antígeno a dicho antígeno en un sujeto administrando la composición al sujeto.
- 30 10. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicha administración se realiza para tratar o prevenir una enfermedad o afección.
11. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dicha enfermedad o afección es una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, una alergia, un rechazo de trasplante o una respuesta hiperinmune.
- 35 12. La composición de la reivindicación 1, en donde el potencial zeta de la partícula está entre -100mV y -30mV.

Figura 1



C.

Partícula	tamaño promedio Z por intensidad (nm)	ζ-potencial (mV)
PLG (Phosphorex)	624.3	-32.7 ± 4.71
PLG-PEMA	429.9	-67.4 ± 10.9
Poliestireno	503.6	-66.4 ± 6.97

Figura 2

Tolerancia Día 7, PLP<sub>178-191</sub>/Enfermedad activa CFA

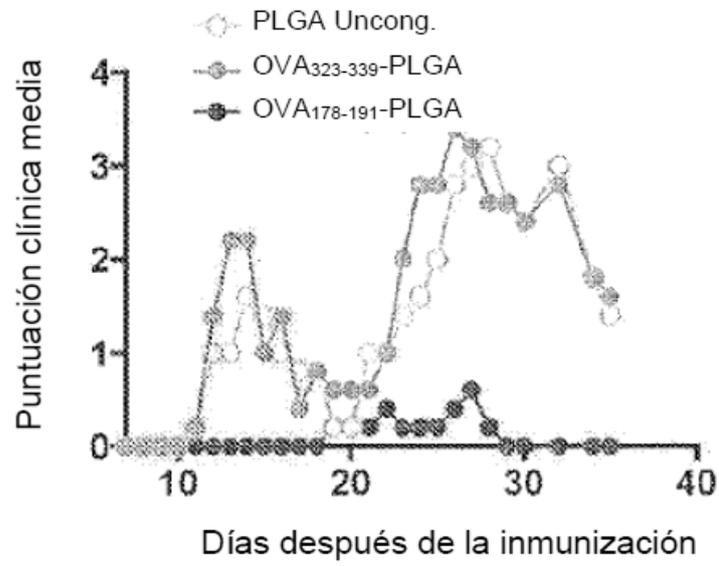


Figura 3A

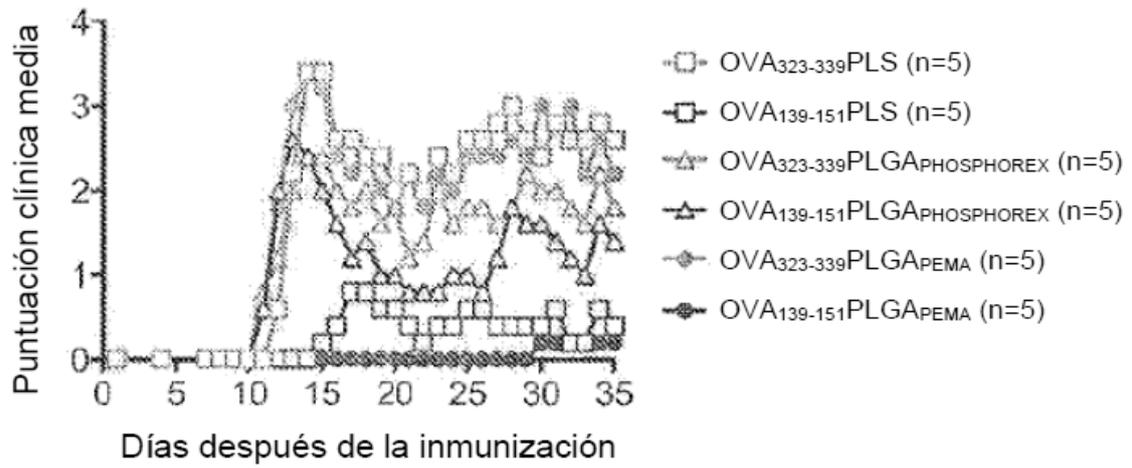


Figura 3B

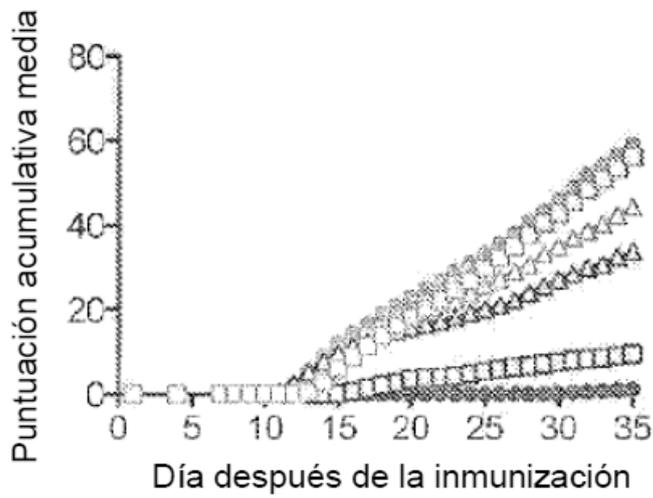


Figura 4

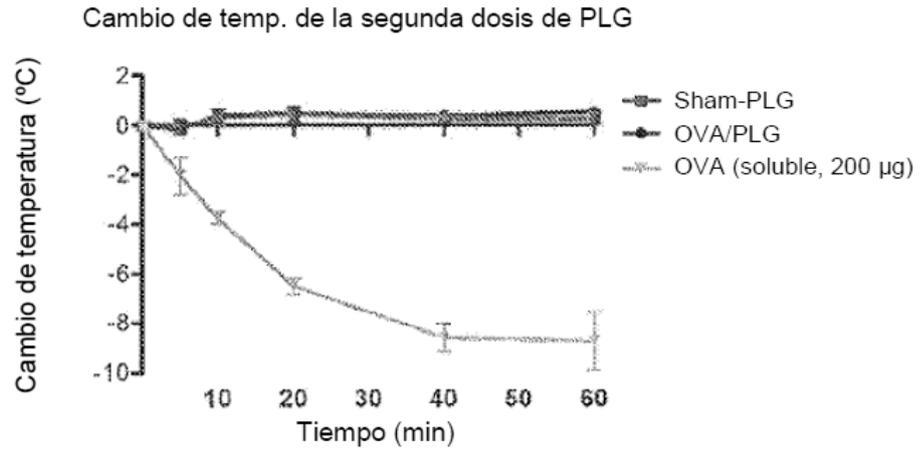
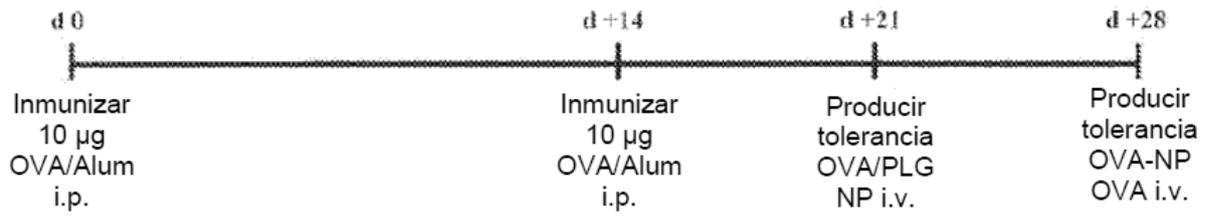
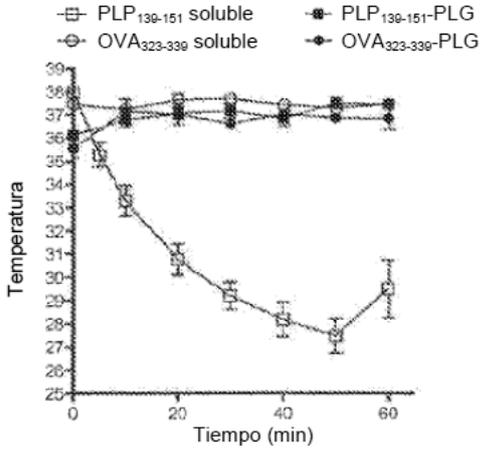


Figura 5

**A.**

Cambio en la temperatura corporal después del tratamiento



\*\*3 de cada 6 ratones en el grupo PLP139 soluble muertos antes del punto de tiempo de 60 min. Los 3 restantes tenían temperaturas que comenzaron aumentando después de 50 minutos y fueron capaces de restablecerse.

**B.**

Producir tolerancia Día +21, PLP<sub>139-151</sub>/Enfermedad activa CFA

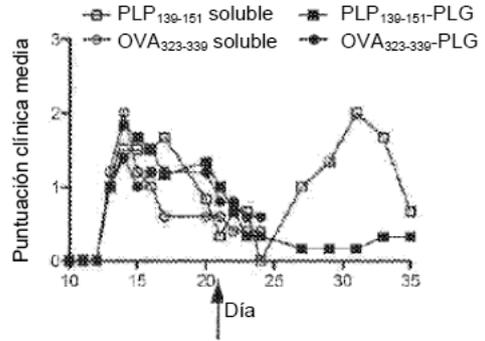


Figura 6

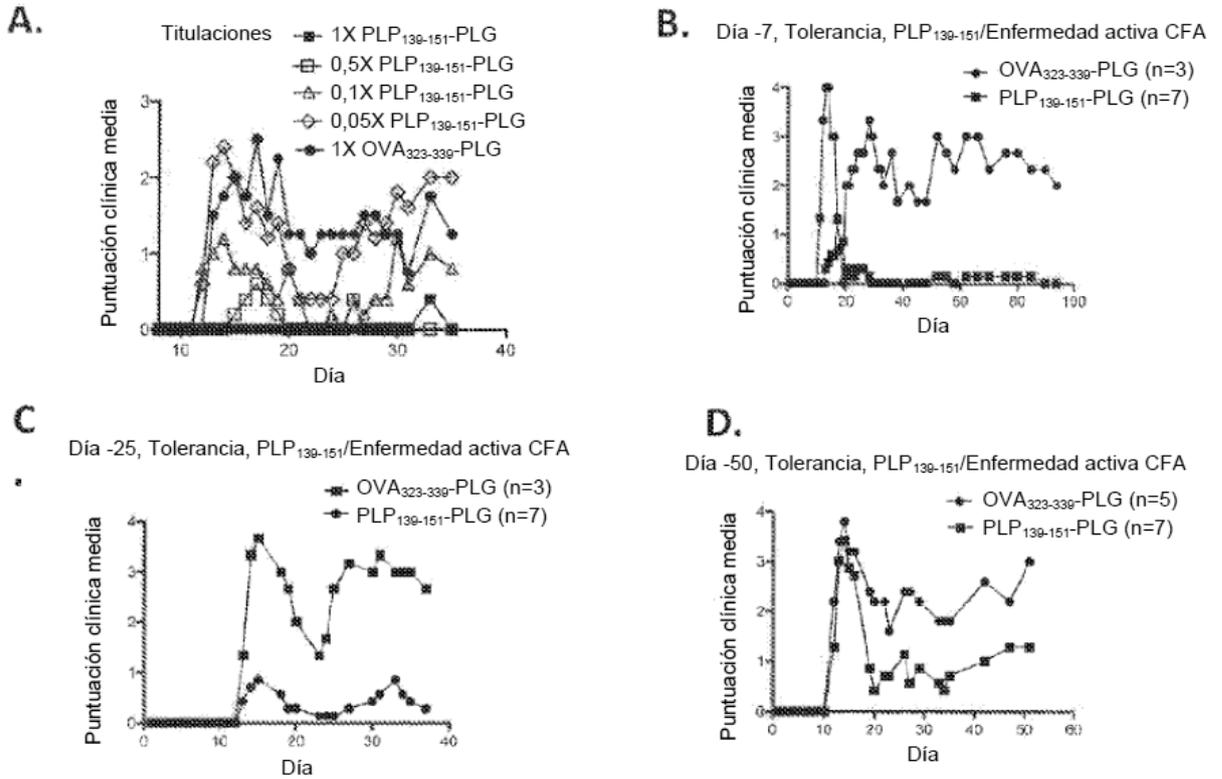
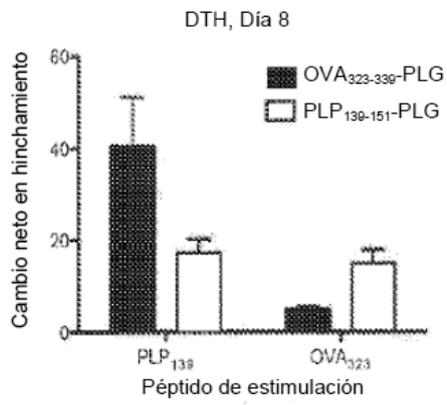


Figura 6

E.



F.

Día -7, Tolerancia, PLP<sub>178-191</sub>/Enfermedad activa CFA

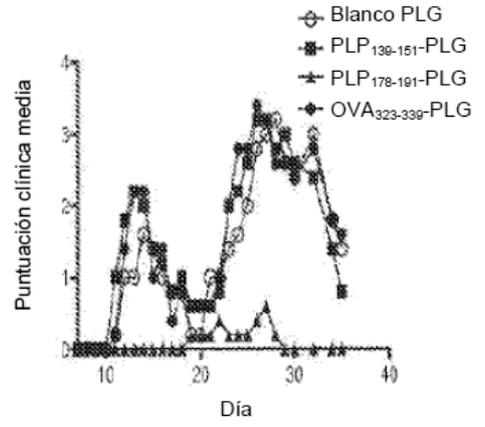


Figura 7

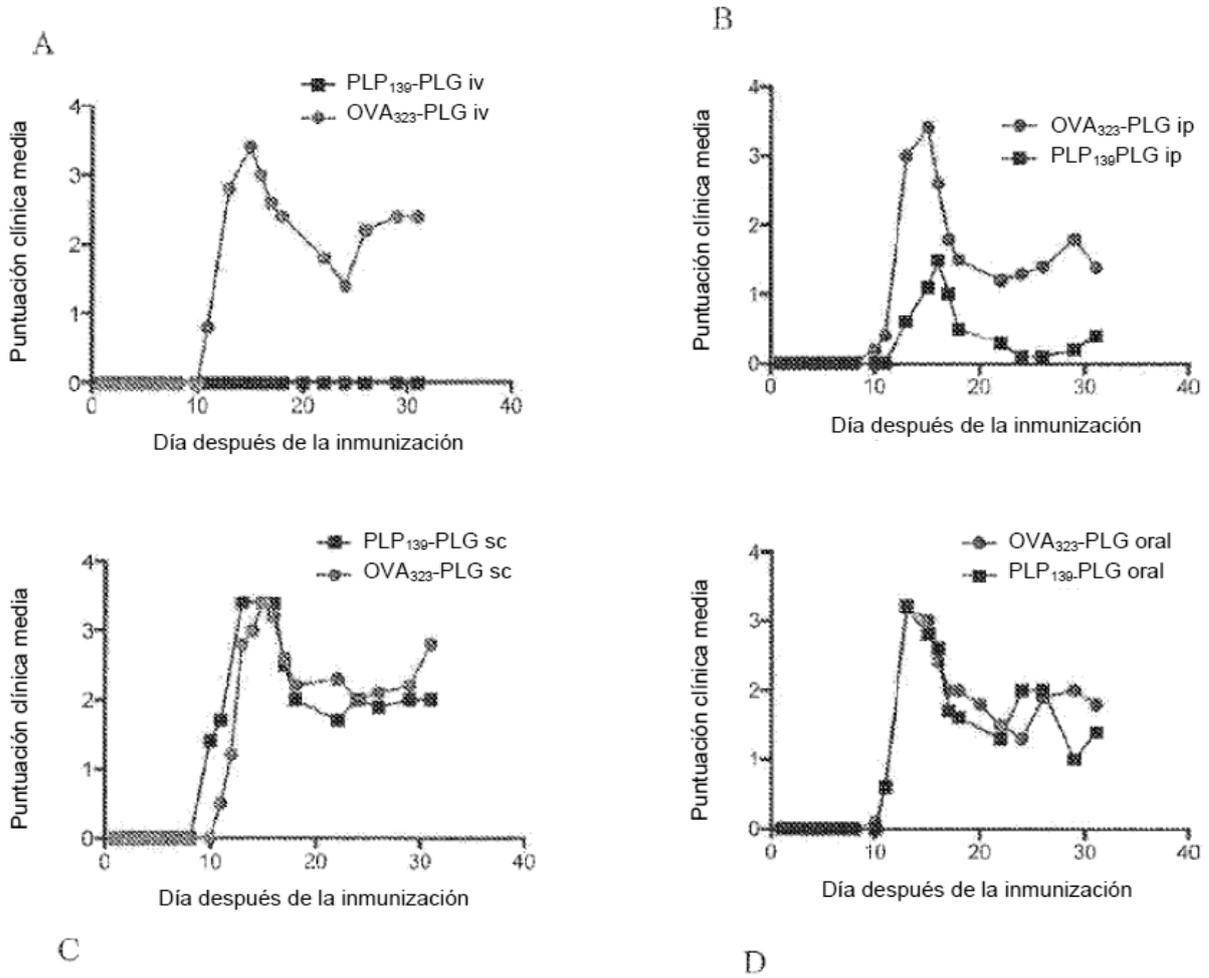


Figura 8

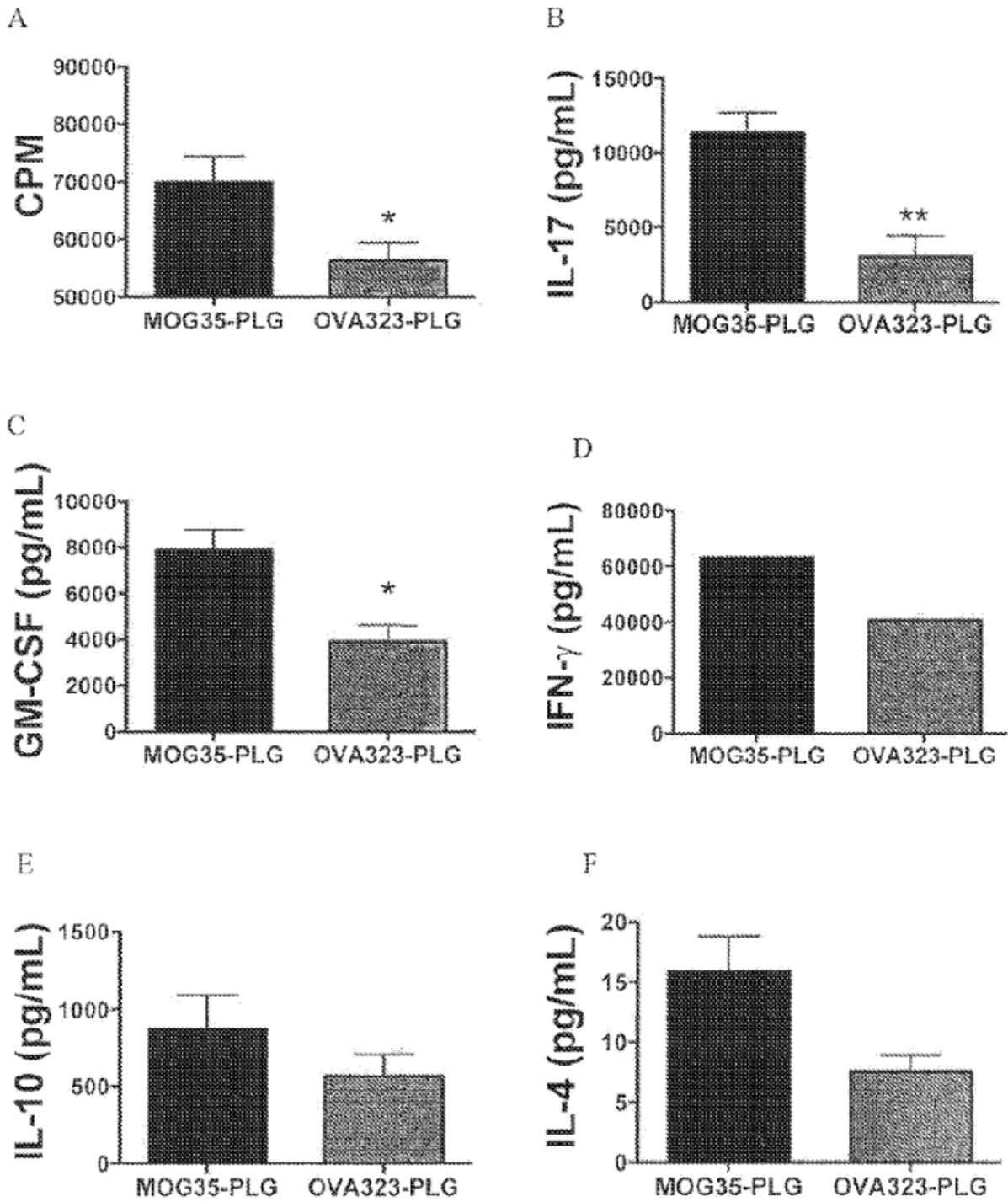


Figura 9

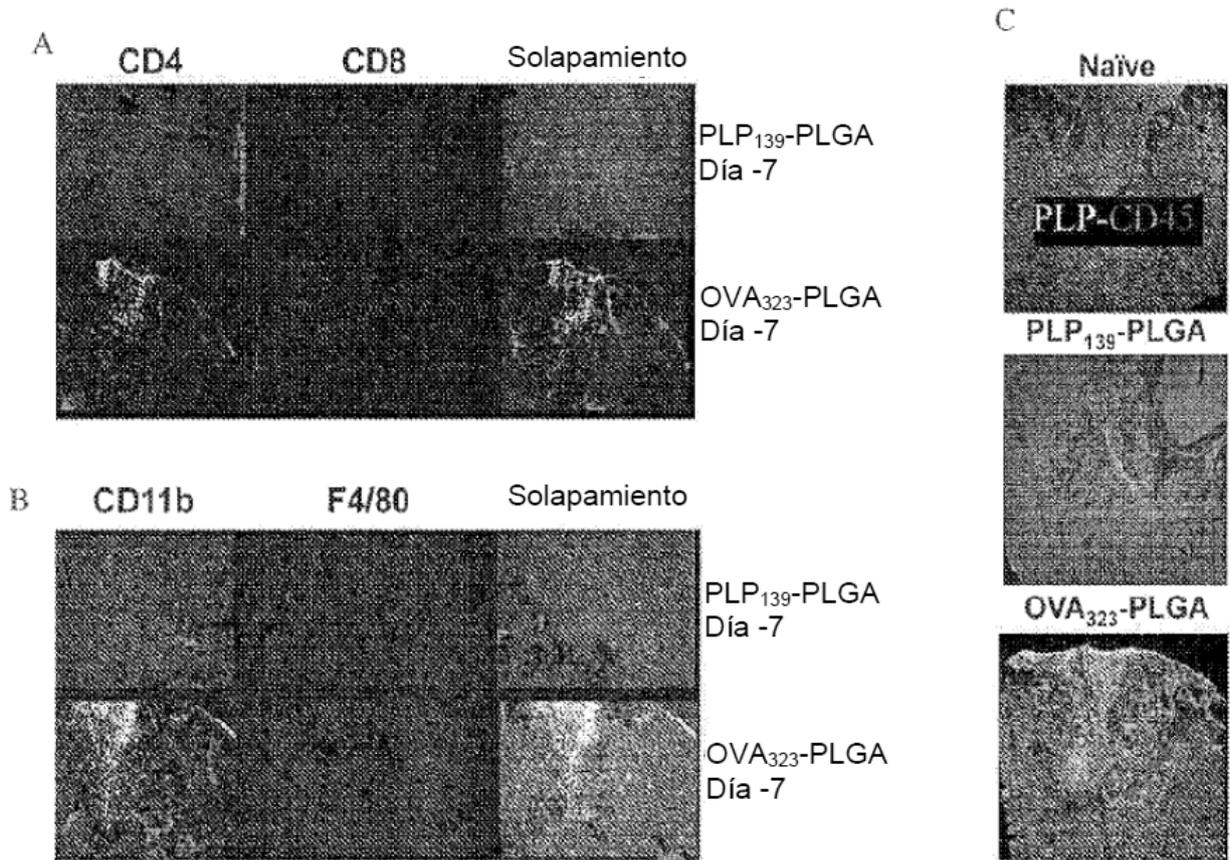


Figura 10

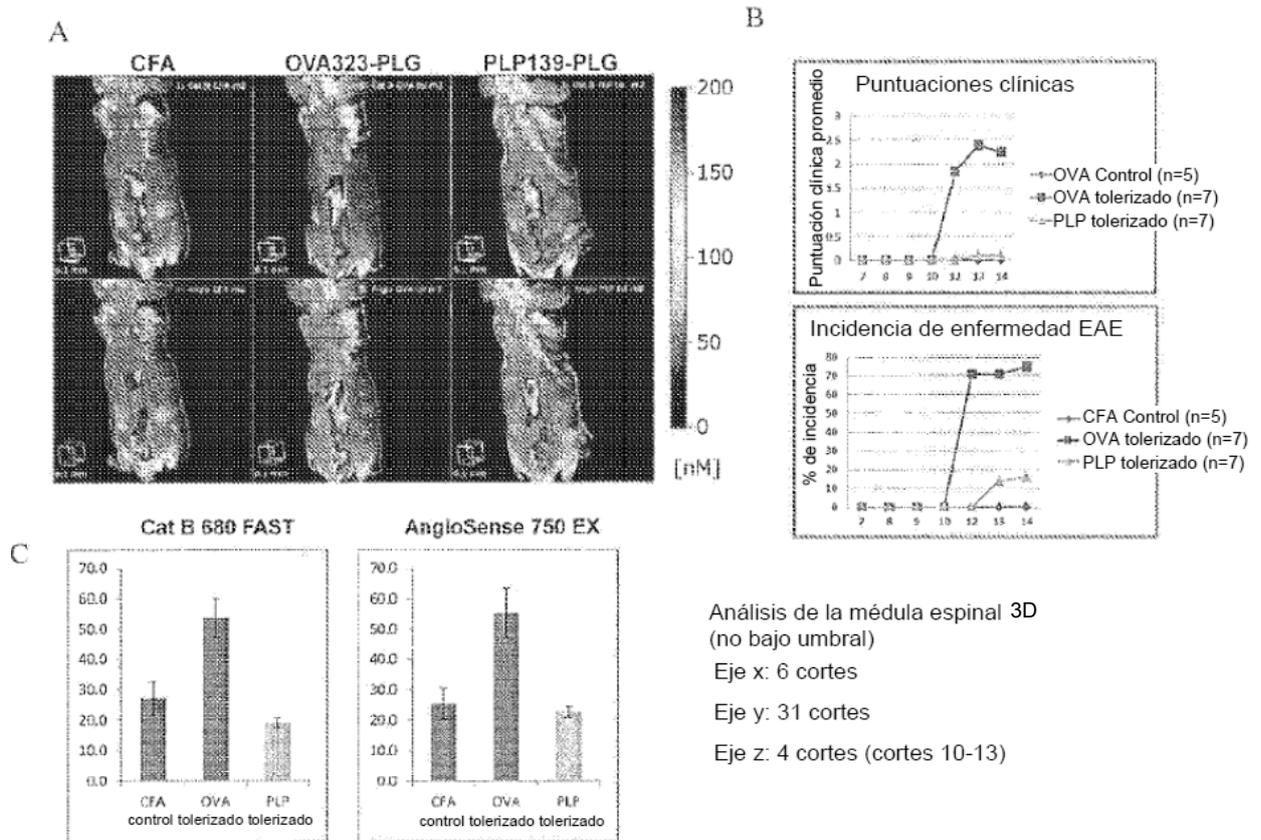
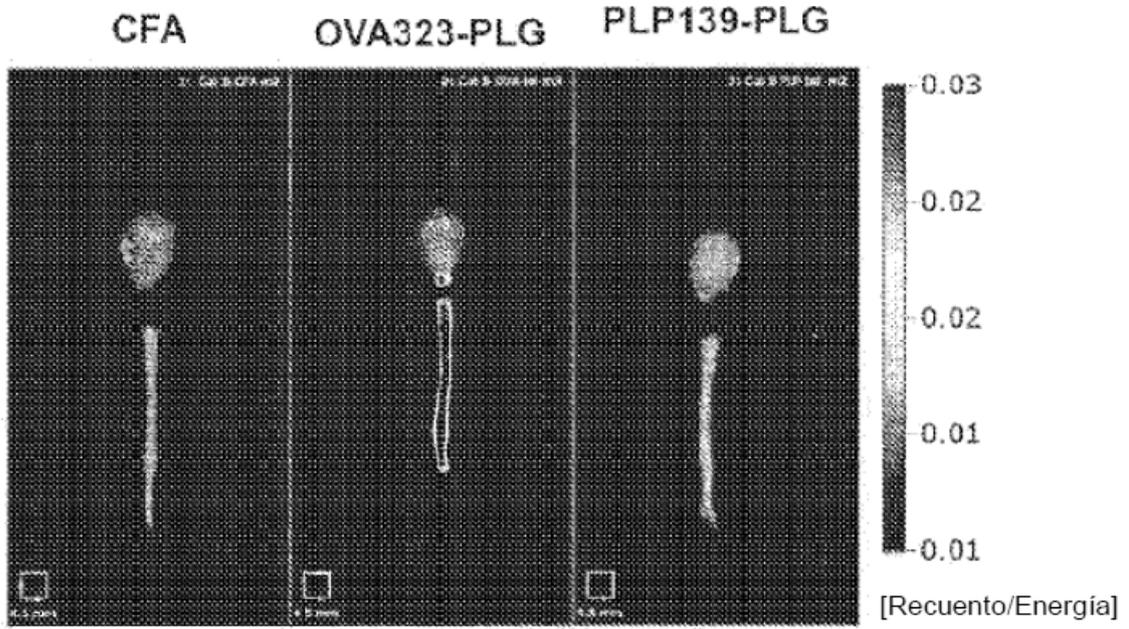


Figura 11A



B

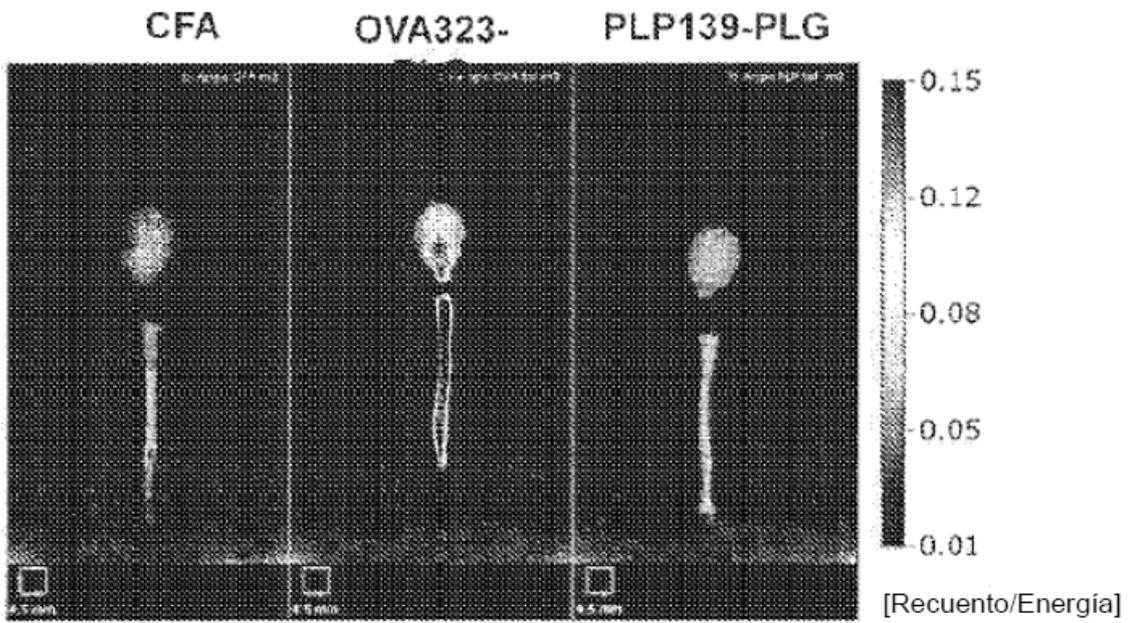


Figura 11

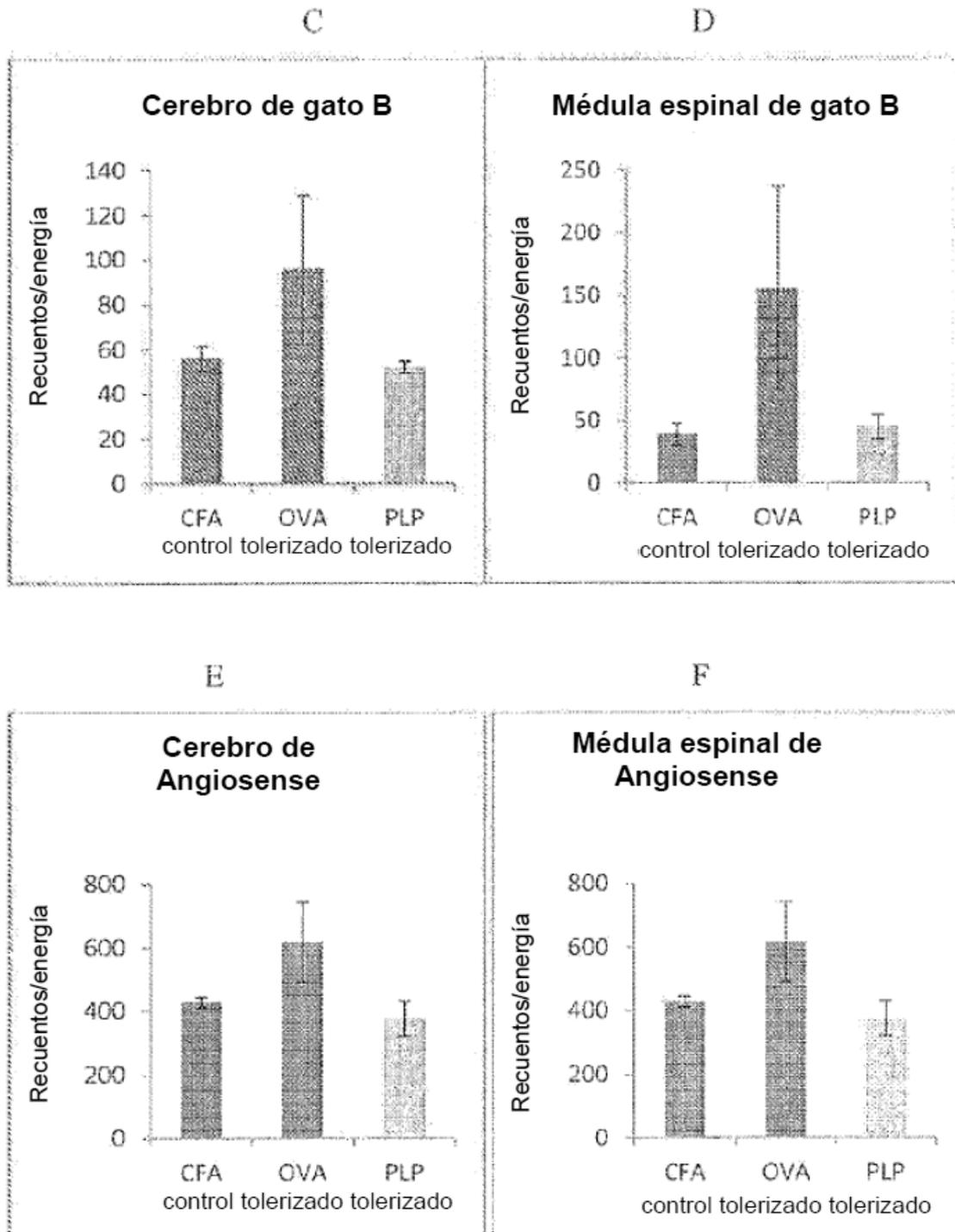


Figura 12

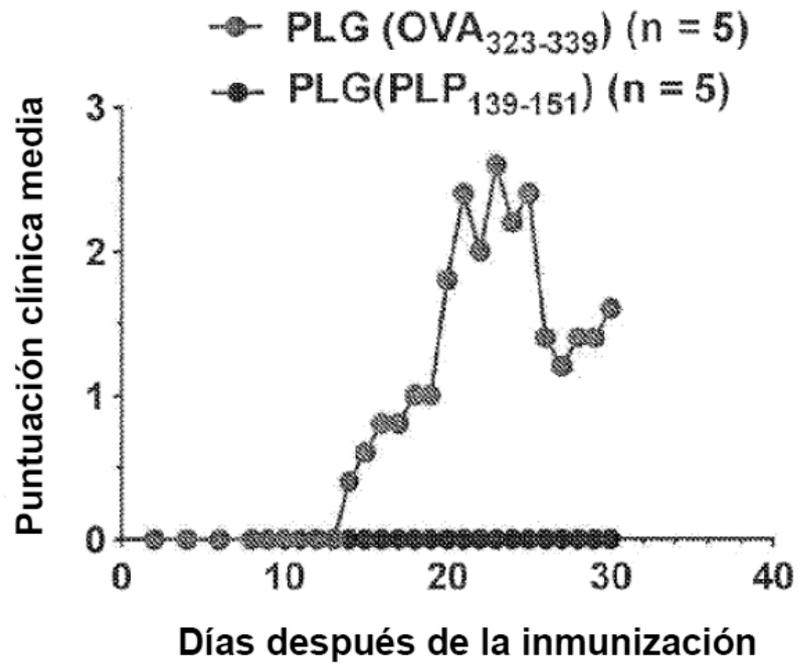


Figura 13

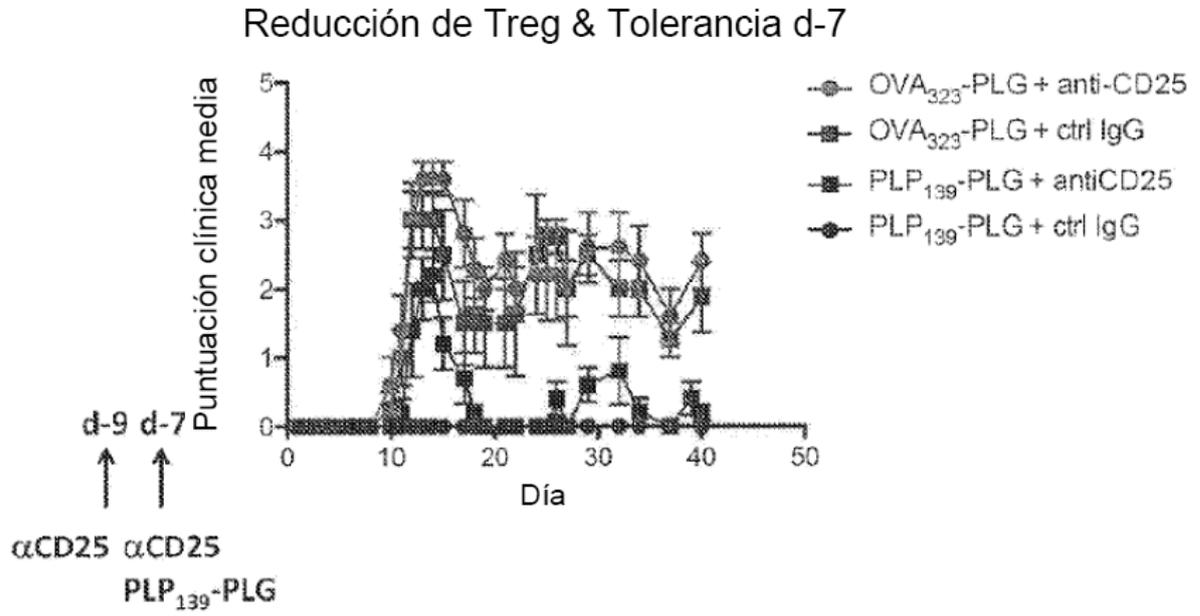


Figura 14

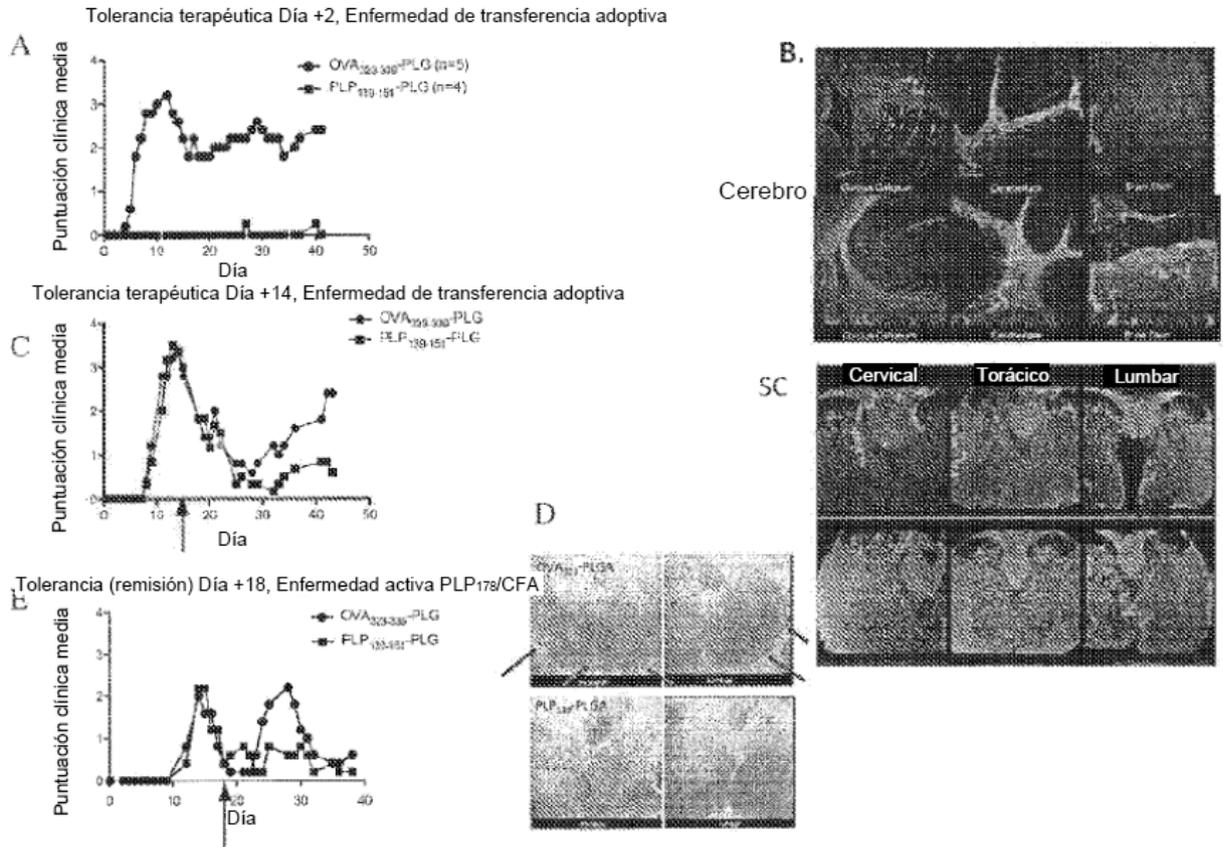


Figura 15

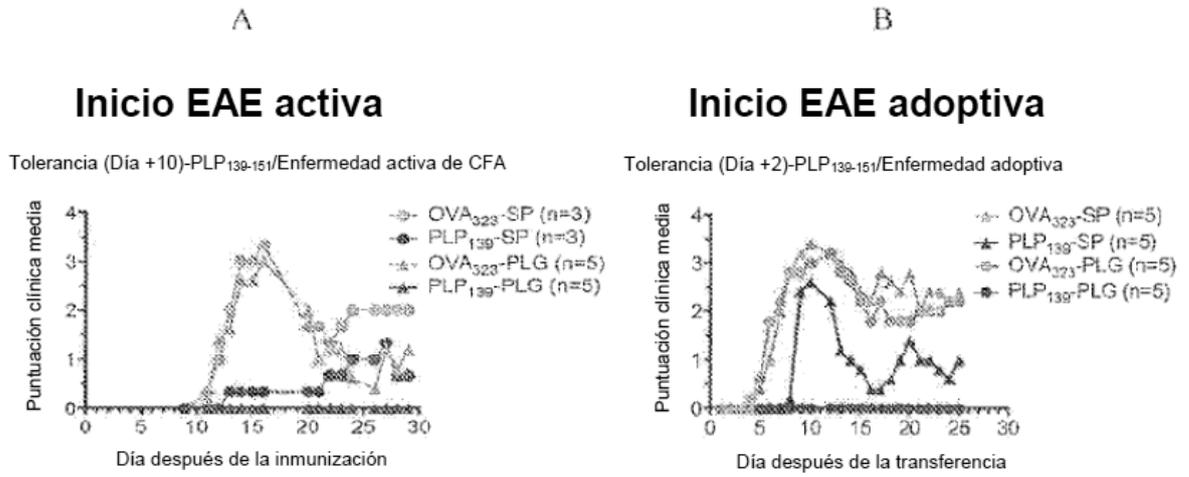


Figura 16

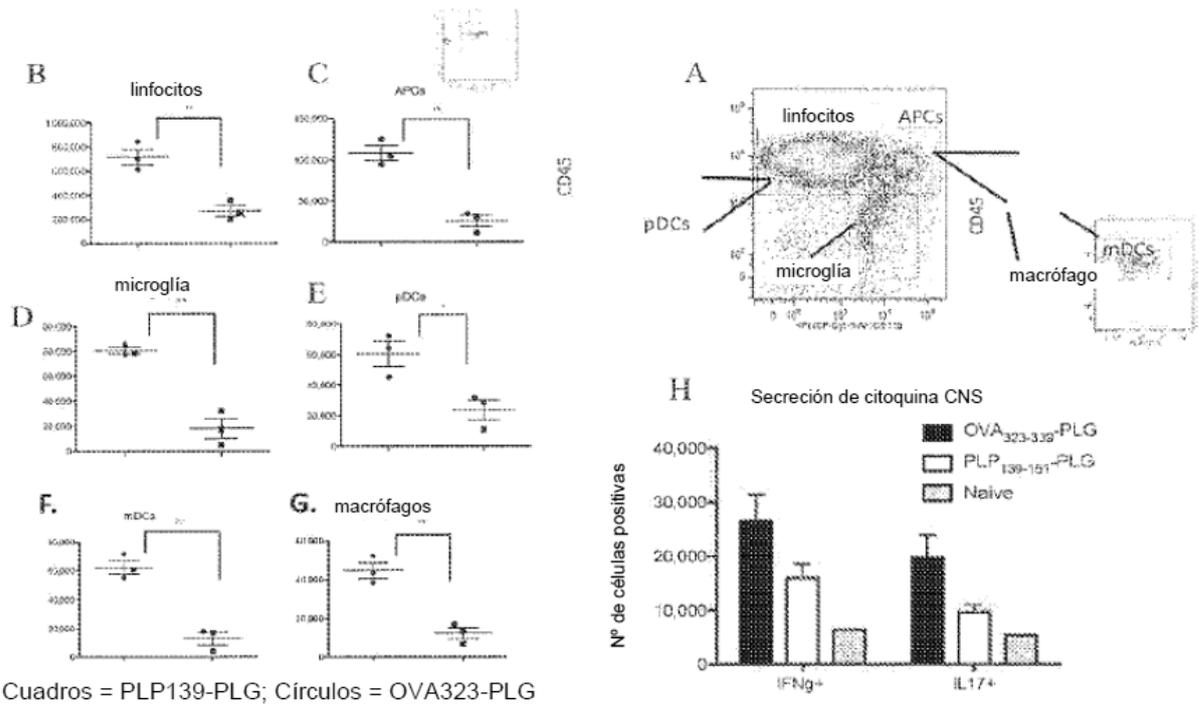
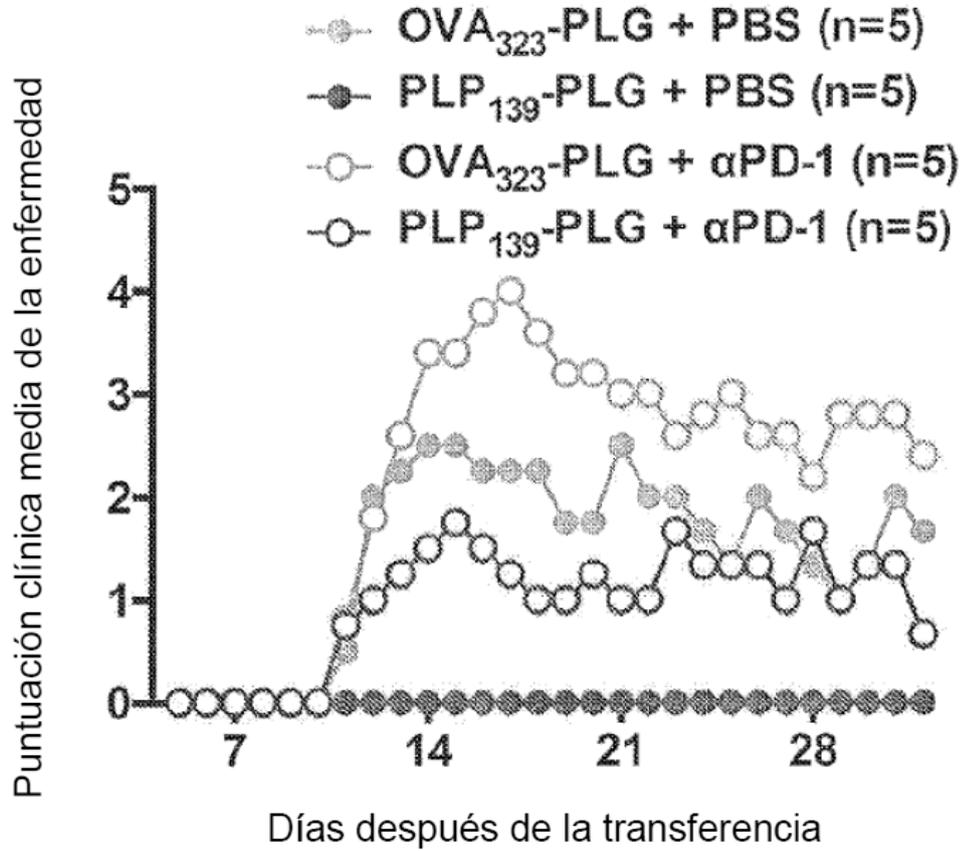
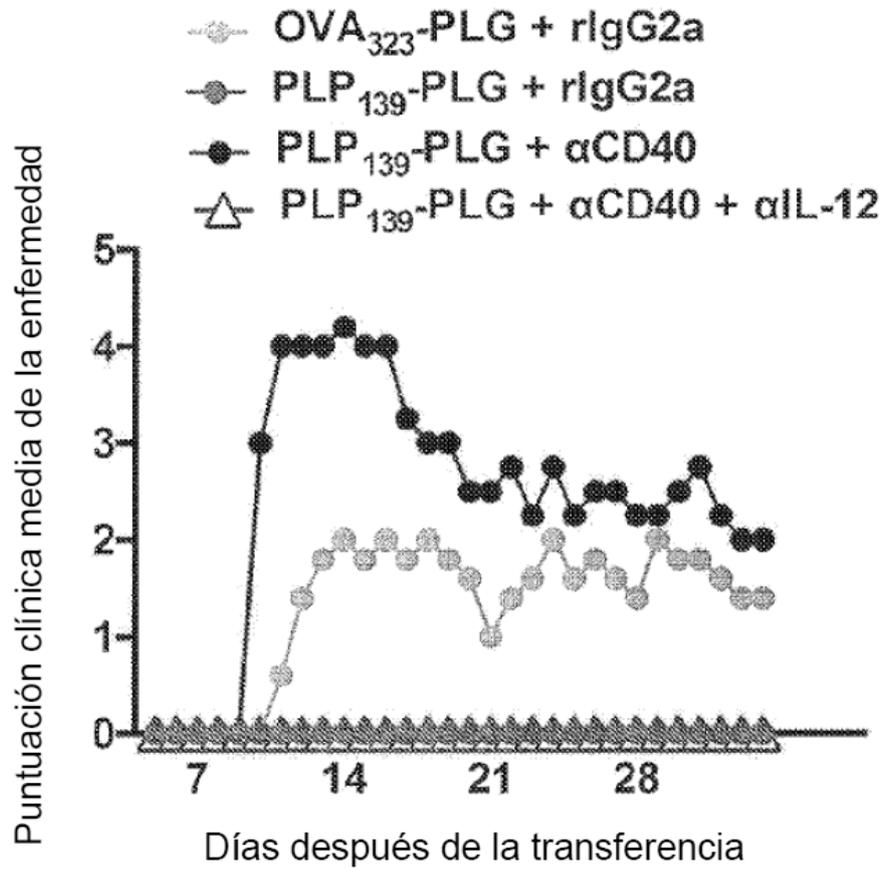


Figura 17



Día 0 –  $3 \times 10^6$  blastocitos T activados i.v. con PLP<sub>139-151</sub>  
 Día +2 – PLG NP encapsulados i.v. con PLP<sub>139-151</sub>  
 Día +2, +4, +6, +8, +10, +12, – 250 µg de anti-PD-1

Figura 18



Día 0 –  $3 \times 10^6$  blastocitos T activados i.v. con PLP<sub>139-151</sub>  
 Día +2 – PLG NP i.v. encapsulados con PLP<sub>139-151</sub>  
 Día +3, – 100 µg de anti-PD-1

Figura 19

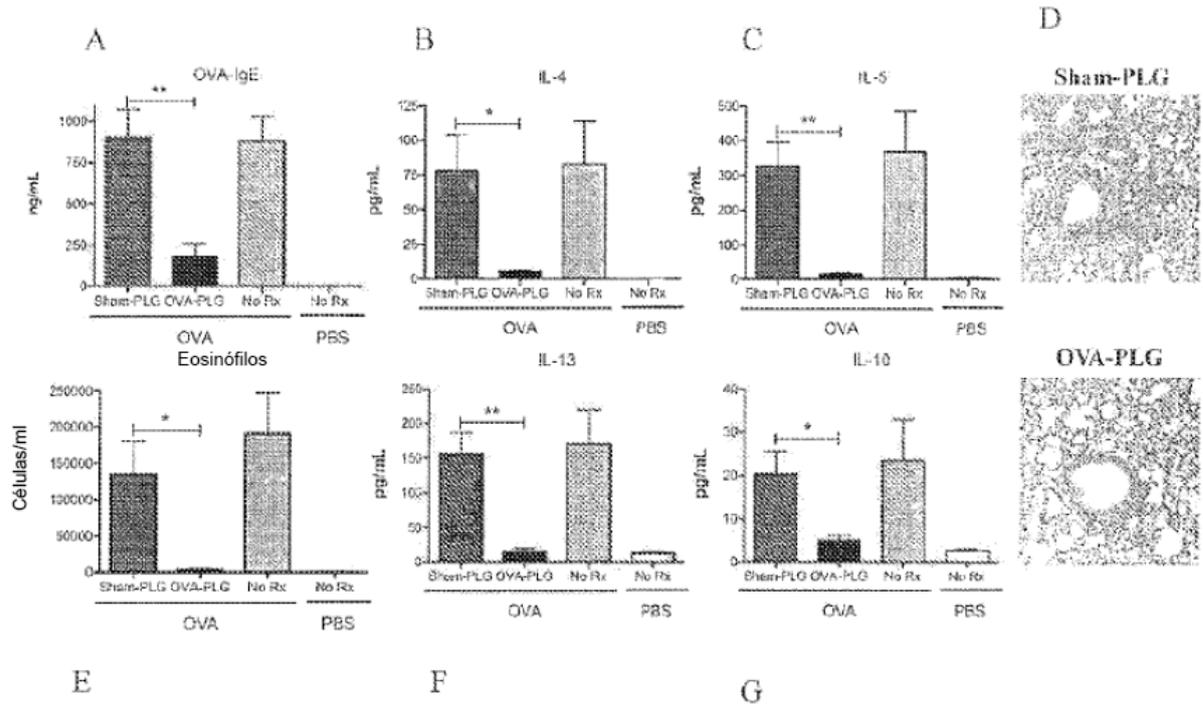


Figura 20

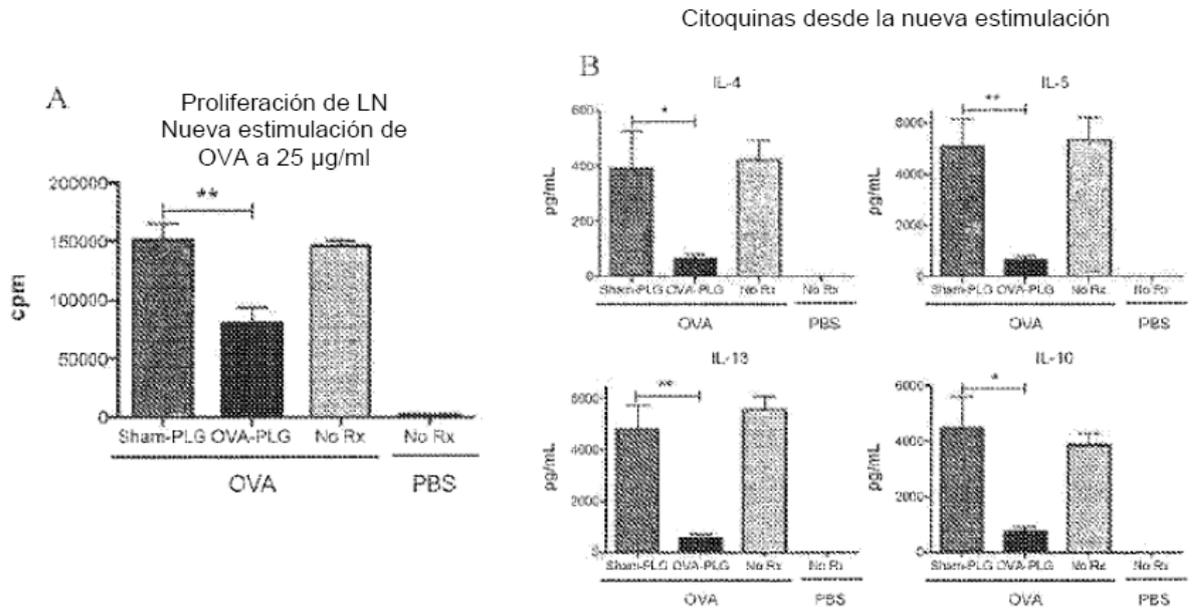


Figura 21

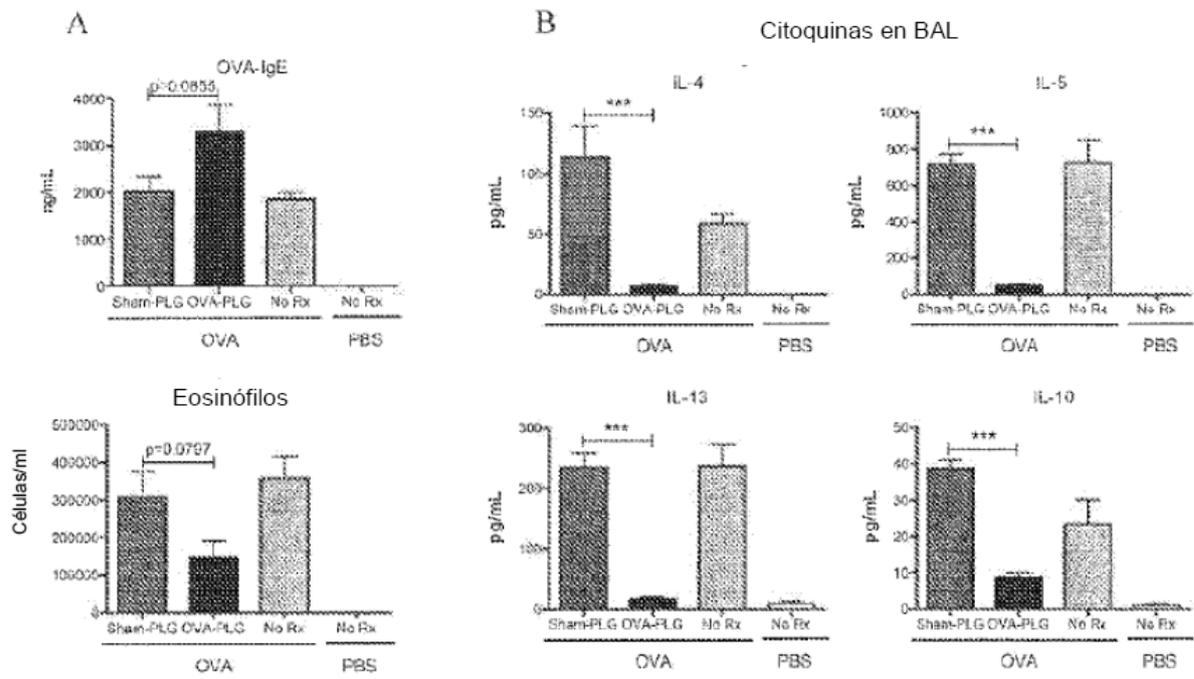


Figura 22

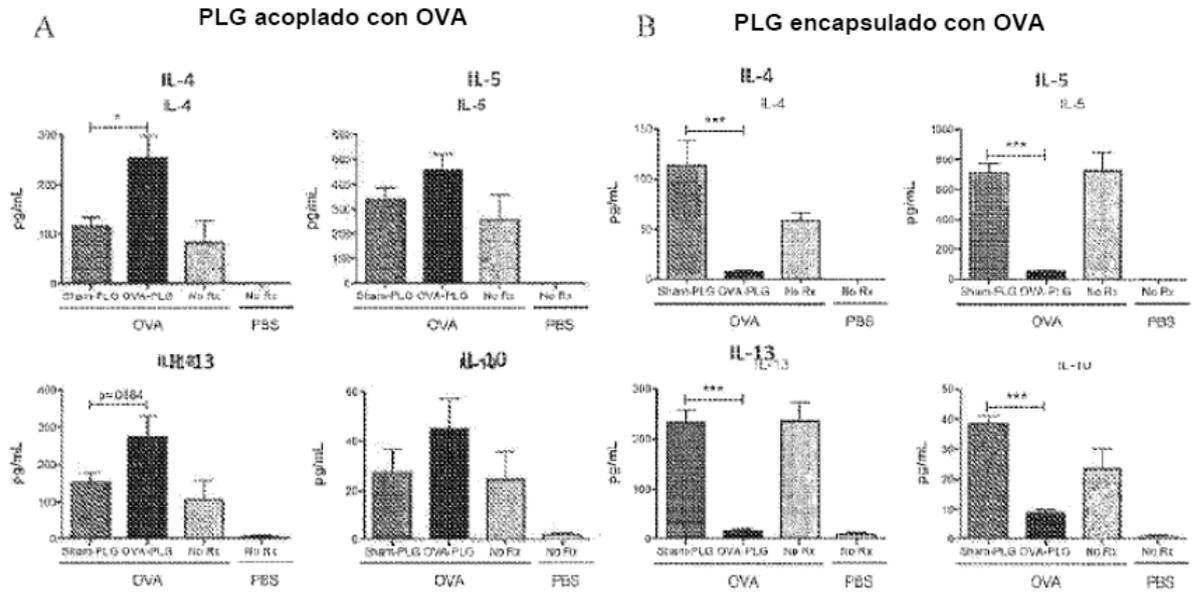
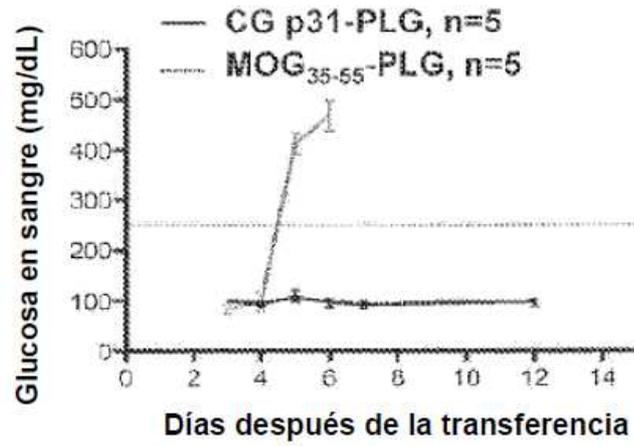
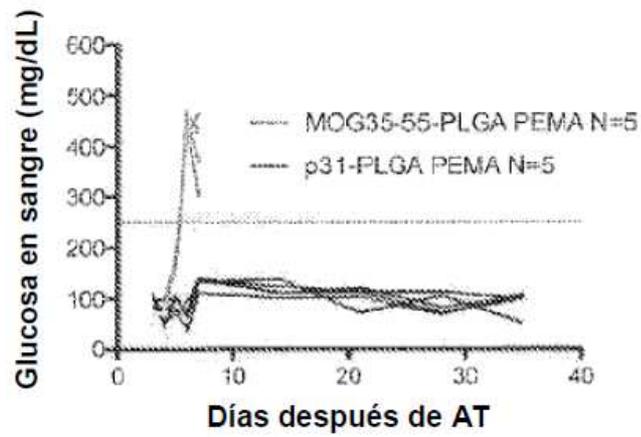


Figura 23

A



B



C

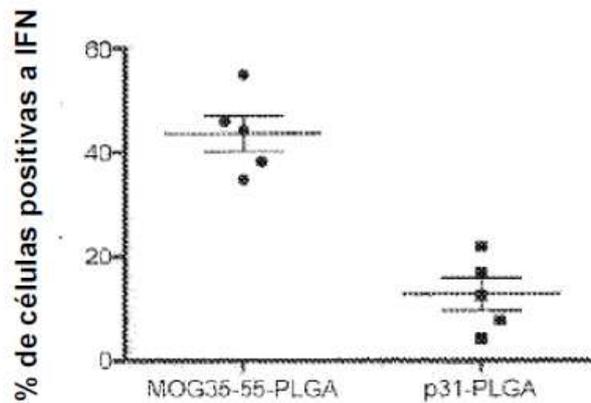
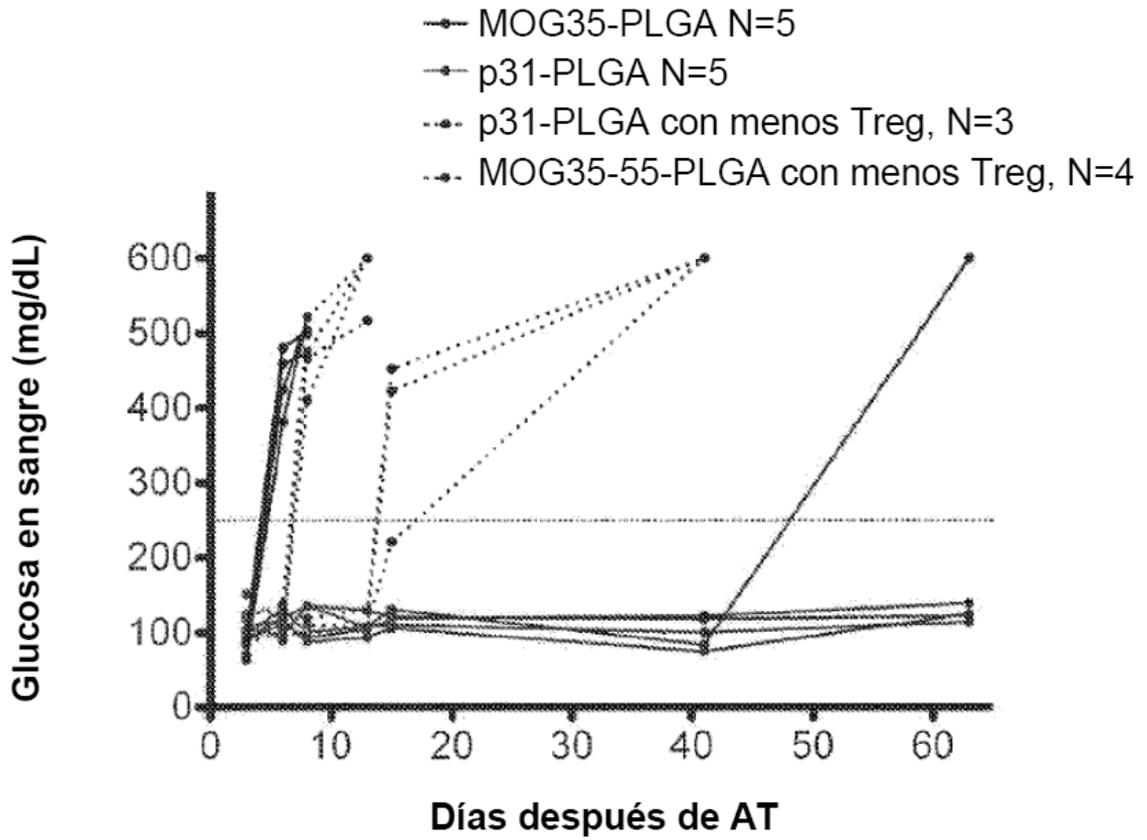


Figura 24

A



B

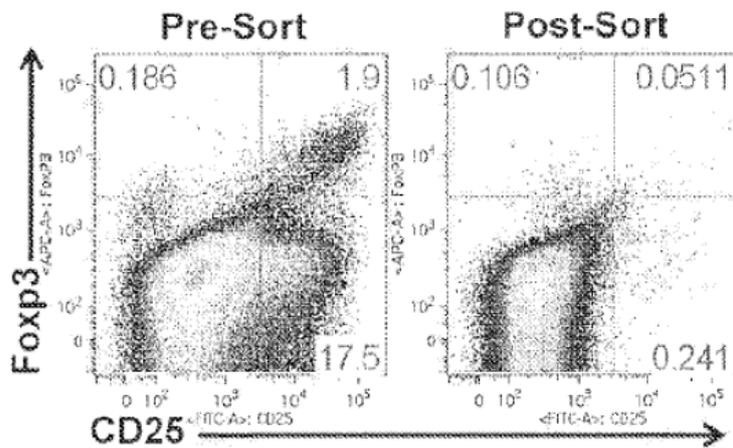


Figura 25

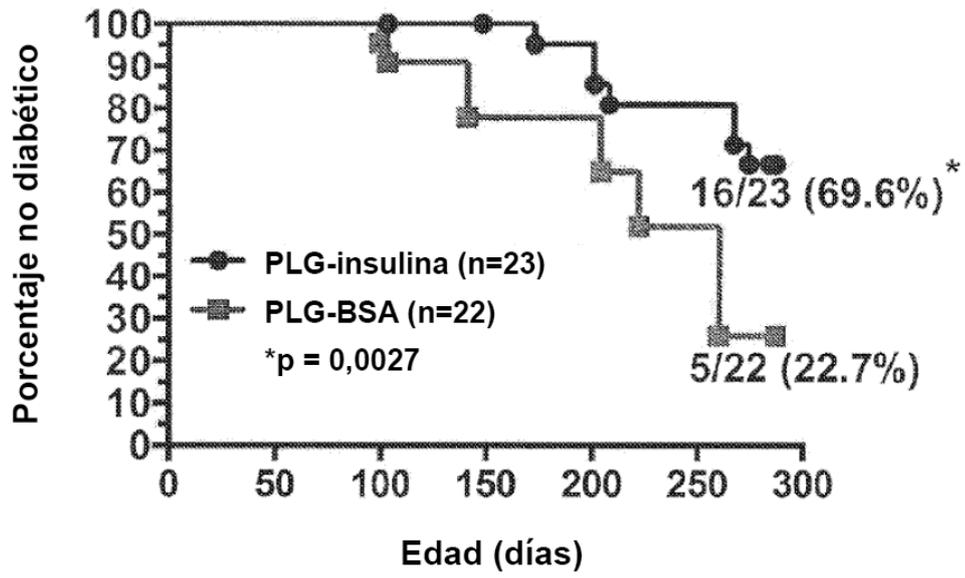


Figura 26

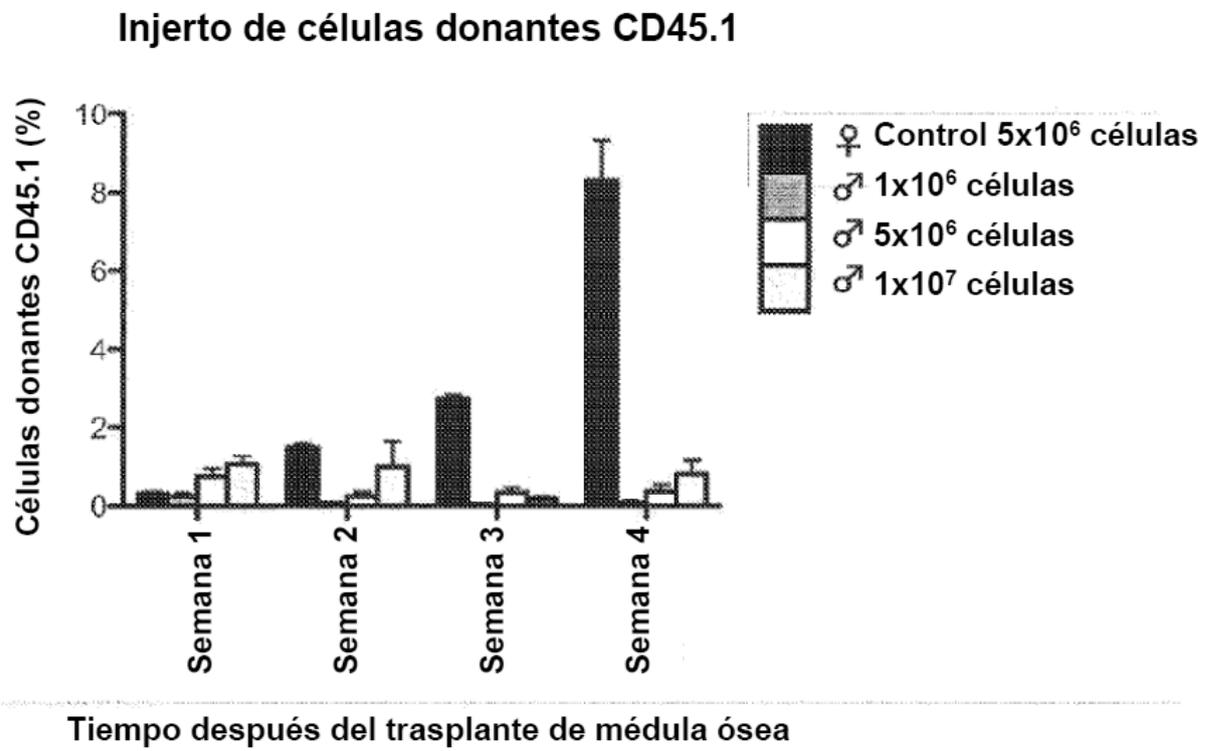


Figura 27

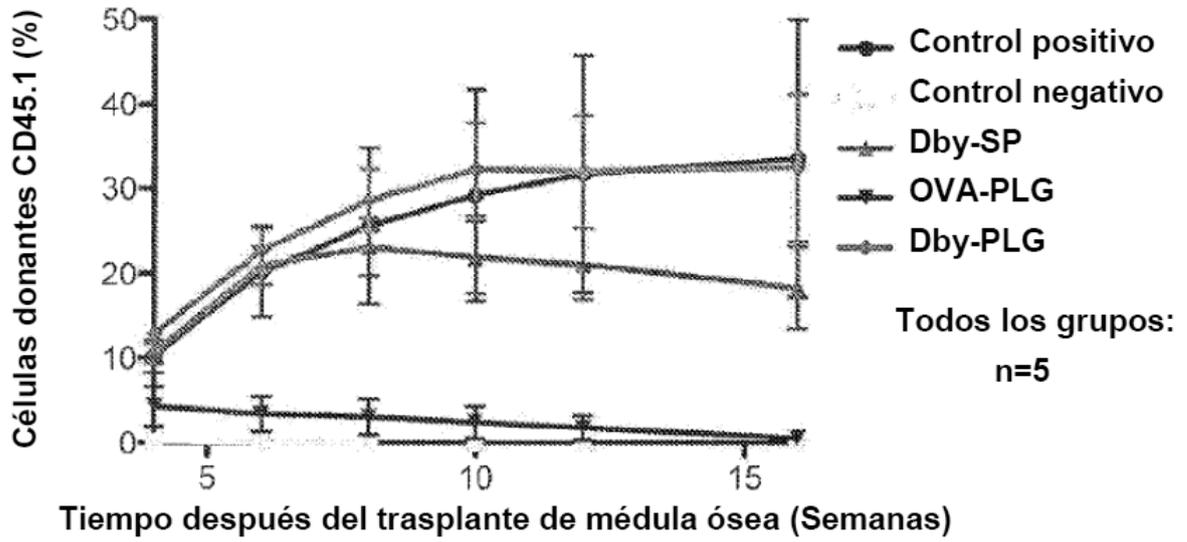


Figura 28

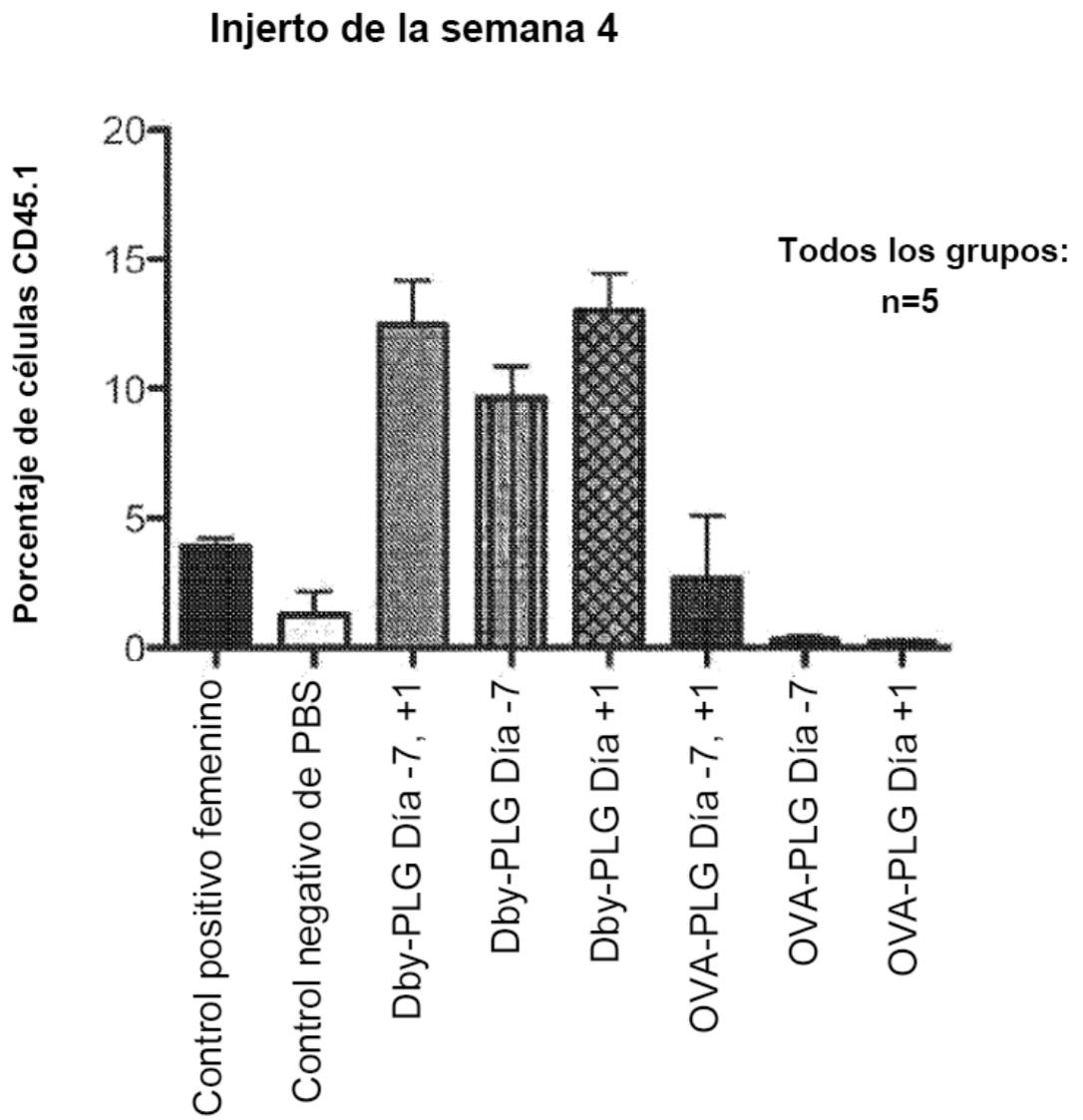


Figura 29

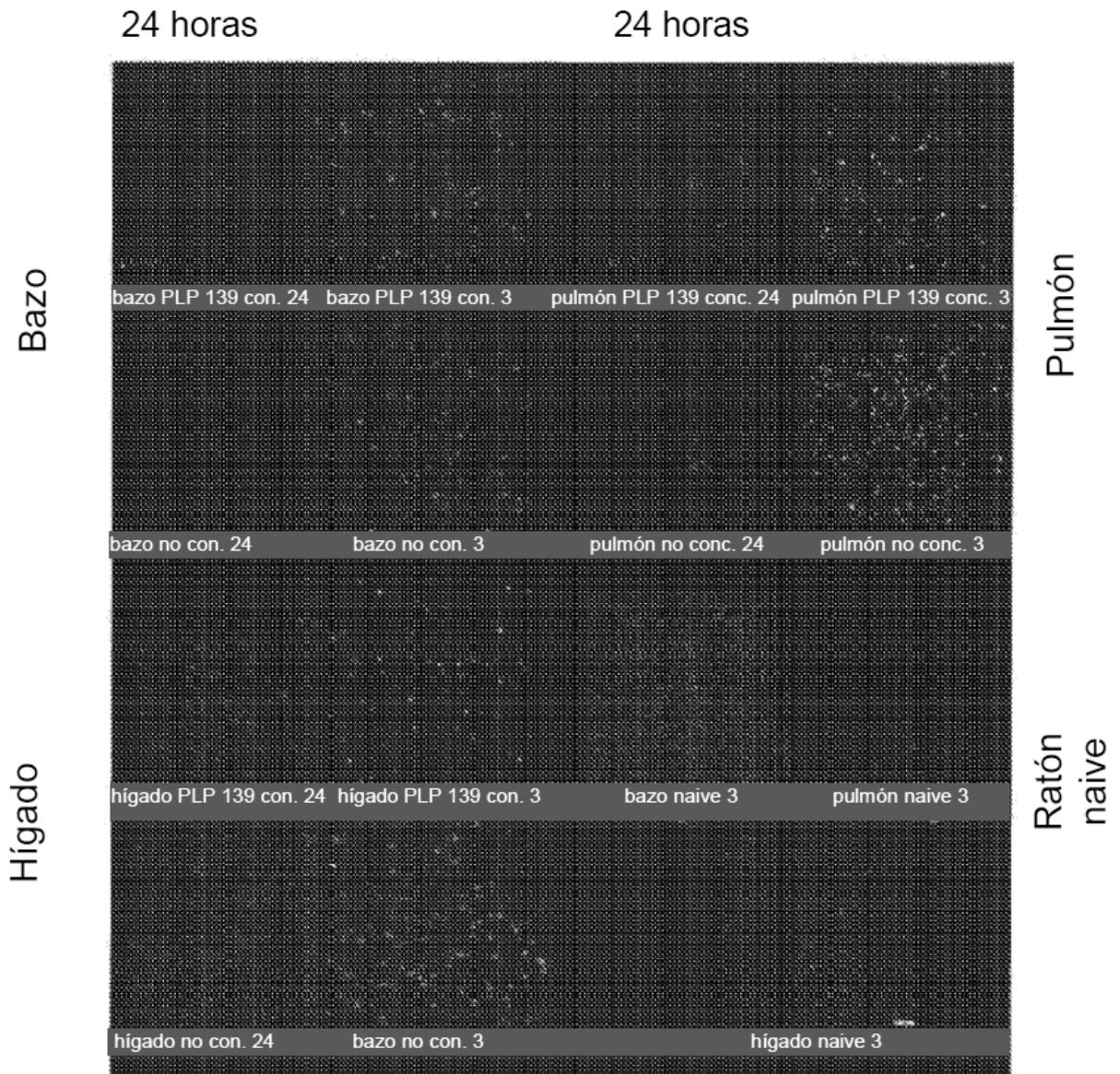


Figura 30

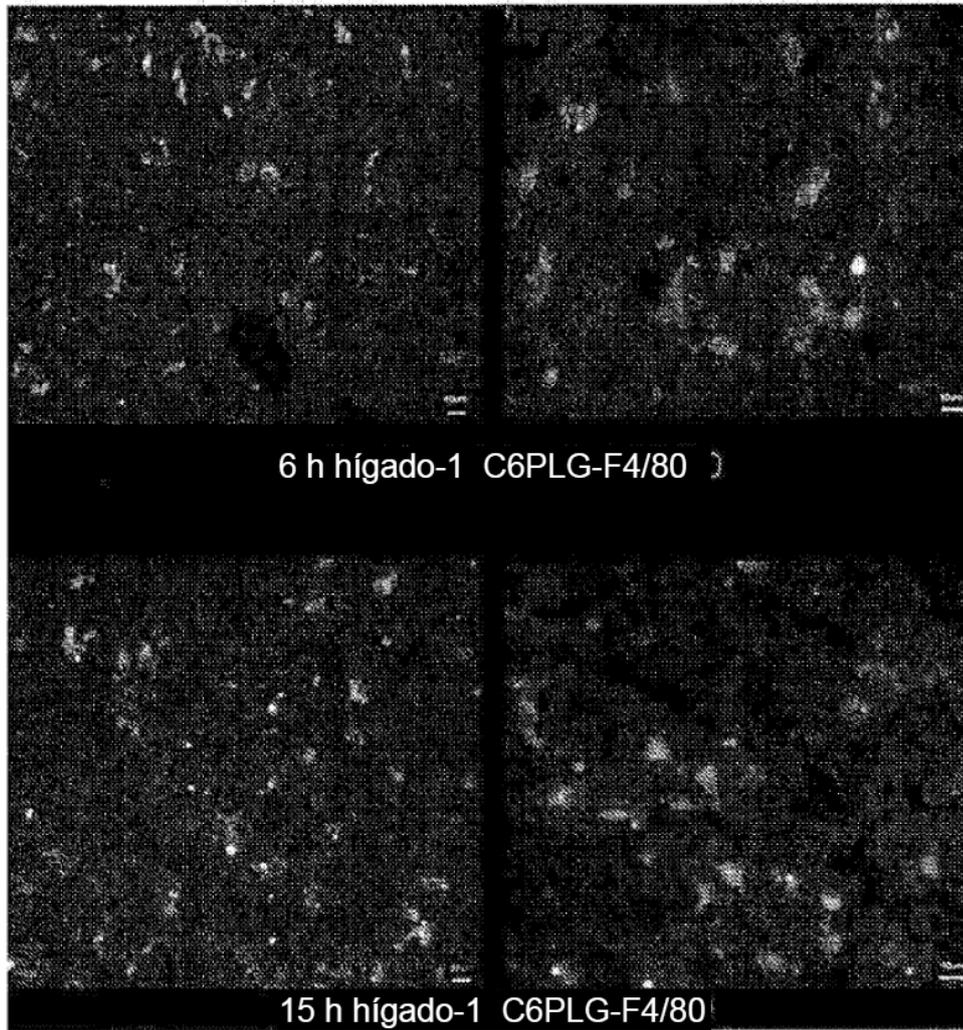


Figura 31

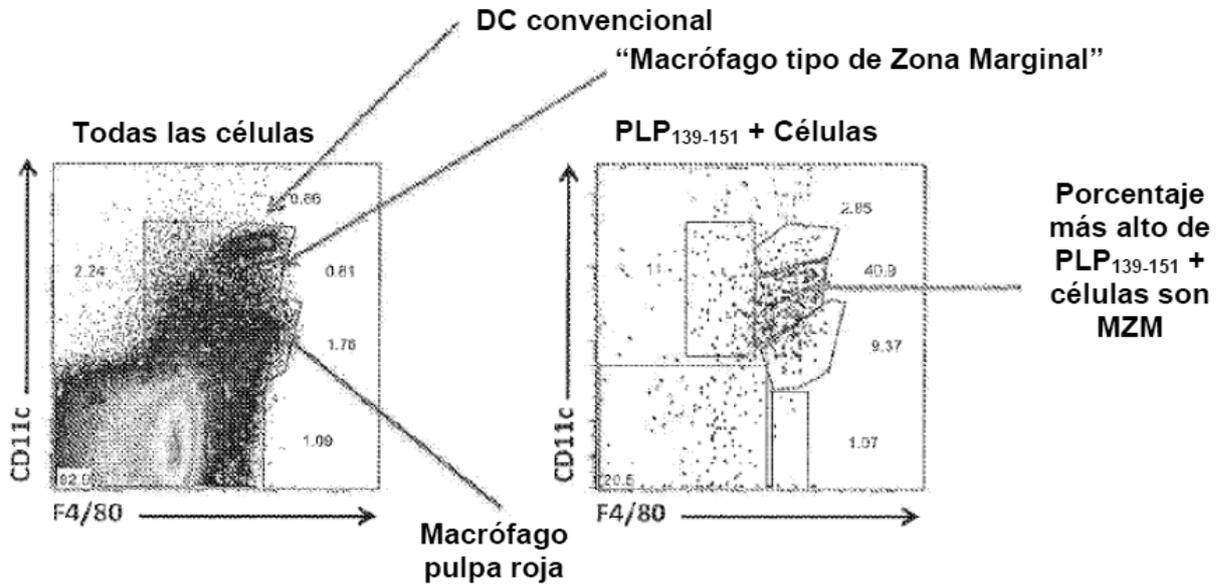


Figura 32

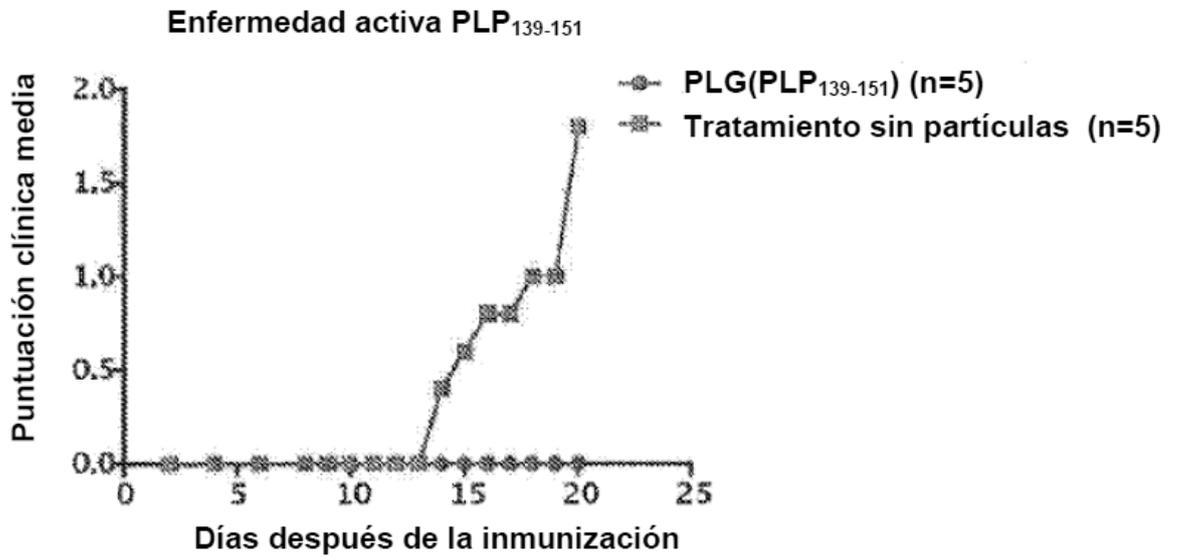


Figura 33

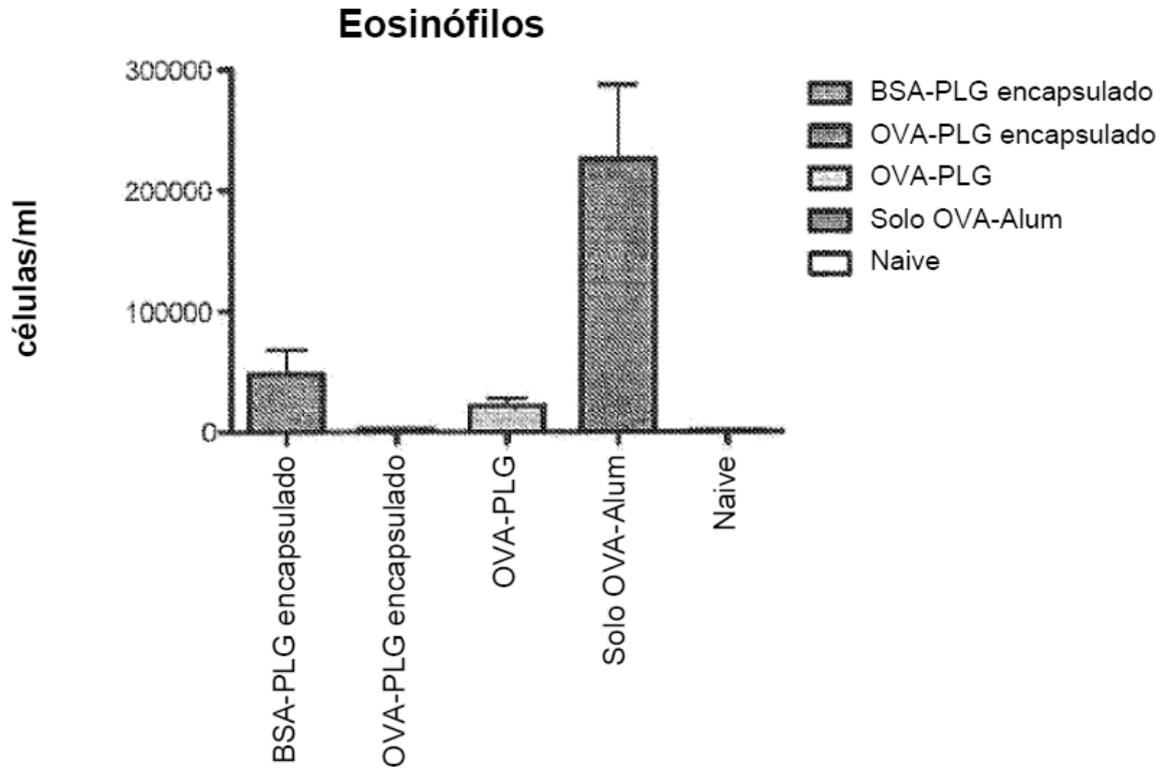


Figura 34

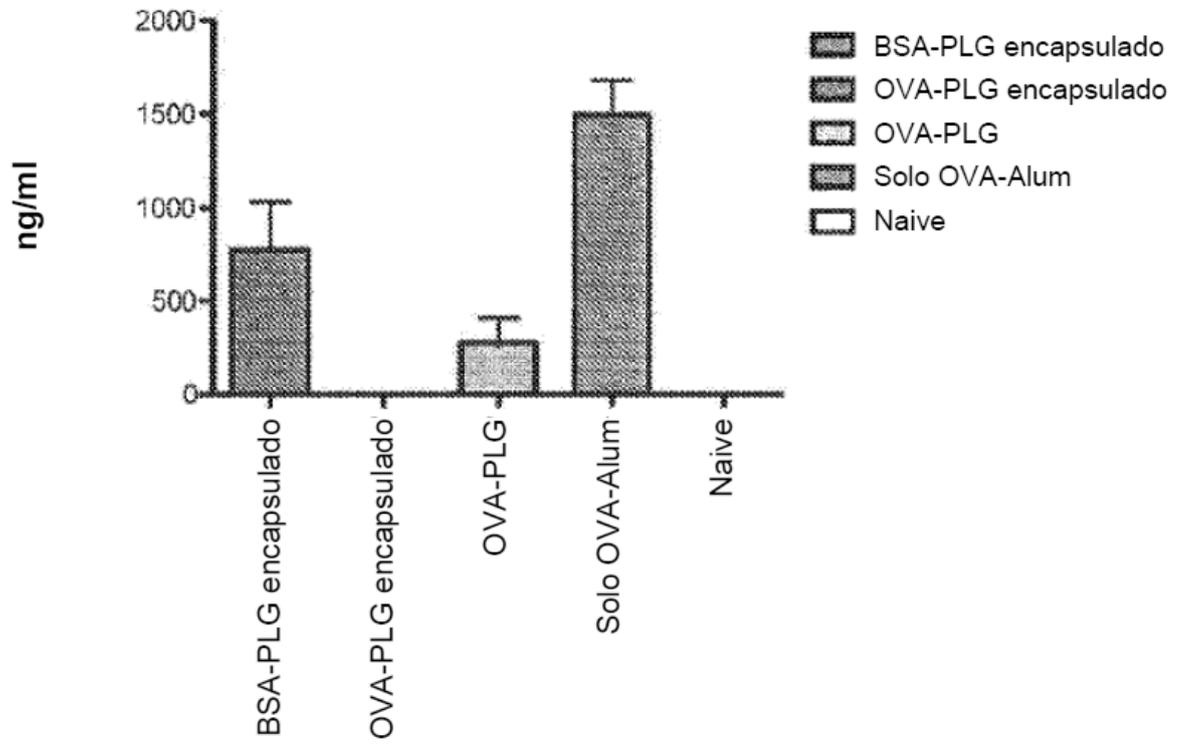


Figura 35

	Tamaño [d, nm]:	% intensidad:	Desv. estándar [d, nm]:
Promedio Z [d, nm]: 584,1	Pico 1: 679,0	100,0	202,7
Pdl: 0,162	Pico 2: 0,000	0,0	0,000
Corte: 0,957	Pico 3: 0,000	0,0	0,000
Calidad del resultado: Buena			

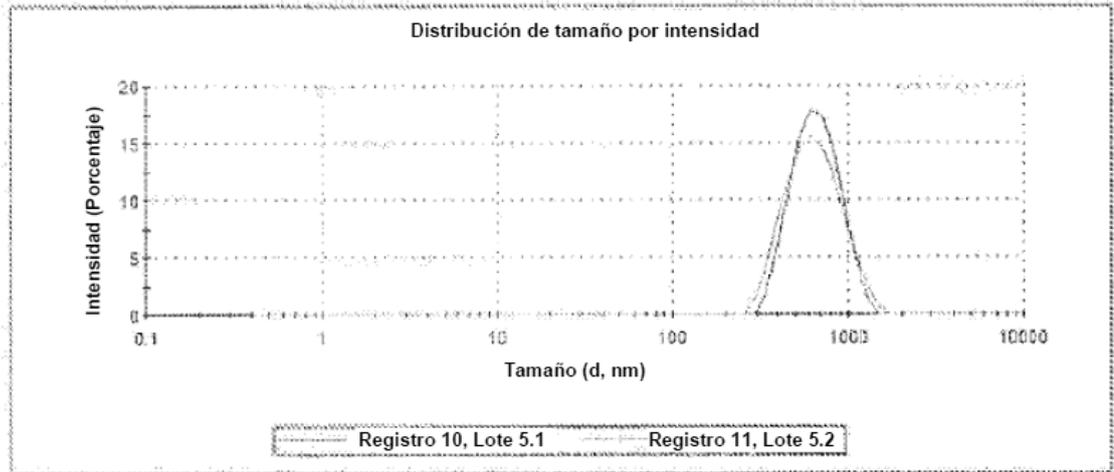


Figura 36

	Media (mV):	Área (%):	Desv. estándar (mV)
Potencial Zeta (mV): 48,9	Pico 1: -48,9	100,0	5,14
Desviación Zeta (mV): 5,14	Pico 2: 0,00	0,0	0,00
Conductividad: 0,103	Pico 3: 0,00	0,0	0,00
Calidad del resultado:			

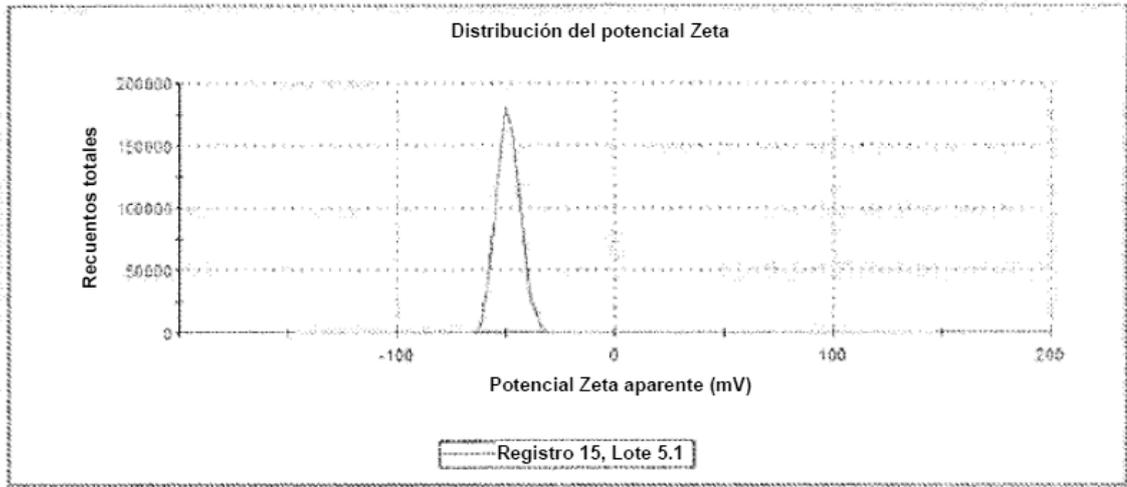


Figura 37

	Tamaño [d, nm]:	% intensidad:	Desv. estándar [d, nm]:
Promedio Z [d, nm]: 569,7	Pico 1: 700,3	100,0	301,2
Pdl: 0,230	Pico 2: 0,000	0,0	0,000
Corte: 0,961	Pico 3: 0,000	0,0	0,000
Calidad del resultado: Buena			

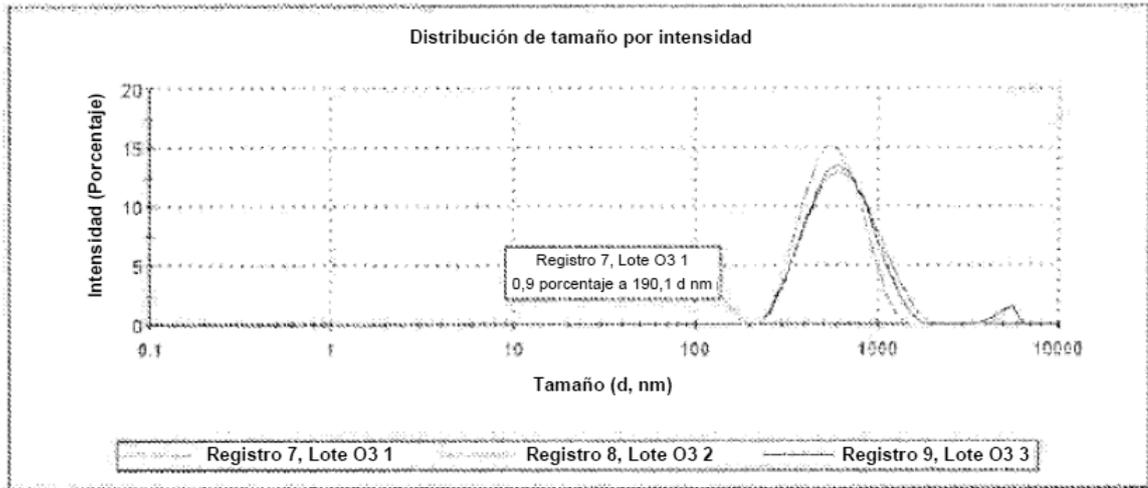


Figura 38

	Media (mV):	Área (%):	Desv. estándar (mV)
Potencial Zeta (mV): 162.2	Pico 1: -52,2	100,0	5,38
Desviación Zeta (mV): 5,38	Pico 2: 0,00	0,0	0,00
Conductividad: 0,0937	Pico 3: 0,00	0,0	0,00
Calidad del resultado: 80,04			

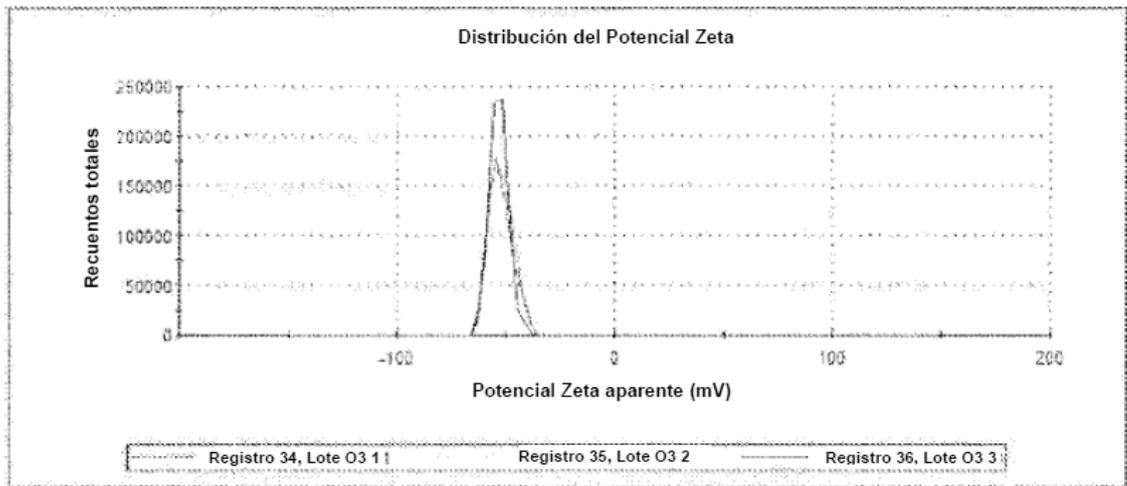


Figura 39

