(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 744 491**

(51) Int. CI.:

A61K 39/02 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2013 PCT/IB2013/052352**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13144811**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2013 E 13722836 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2830654**

(54) Título: **Procedimientos y composiciones para el tratamiento de la inflamación**

(30) Prioridad:

26.03.2012 US 201261615743 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

SANTAMARIA, PEDRO

(74) Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

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

Procedimientos y composiciones para el tratamiento de la inflamación

Campo de la divulgación

La presente divulgación está dirigida a composiciones y procedimientos relacionados con inmunoterapia y medicina. En particular, la presente divulgación está relacionada con la terapéutica para el tratamiento de la inflamación, por ejemplo, inflamación del tracto gastrointestinal.

Antecedentes

La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) es el nombre de un grupo de trastornos que provocan la inflamación (enrojecimiento y tumefacción) de los intestinos. Más de 600,000 estadounidenses tienen algún tipo de enfermedad inflamatoria intestinal cada año. Este grupo de enfermedades a menudo es de naturaleza crónica y está asociado con síntomas como dolor abdominal, vómitos, diarrea, sangrado rectal, calambres internos/espasmos musculares severos en la región de la pelvis y pérdida de peso. Los síntomas asociados con la IBD pueden limitar la calidad de vida y afectar el ritmo diario de las personas afectadas.

Las modalidades de tratamiento de la IBD incluyen principalmente inmunosupresores que disminuyen la inmunidad general del paciente. Tal tratamiento es arriesgado y a menudo pone al paciente en riesgo de infección y enfermedad debido a la inmunidad comprometida.

Existe una necesidad en la técnica de terapias dirigidas que traten la enfermedad, pero que no comprometan la inmunidad general del paciente. La presente divulgación satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

Sue Tsai et al.: "Reversal of Autoimmunity by Boosting Memory-like Autoregulatory T Cells" (Reversión de la autoinmunidad al estimular las células T autorreguladoras de tipo memoria", Immunity, Cell Press, vol. 32, no. 4, 2010, págs. 568-580, divulgan nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con complejos péptido-MHC (pMHC) relevantes para T1D y su capacidad para prevenir enfermedades en ratones.

Sumario

La presente invención está dirigida a nanopartículas y composiciones, así como a sus usos médicos, como se menciona en las reivindicaciones. Además, en la presente memoria descriptiva, se describen procedimientos terapéuticos y composiciones que activan y amplifican mecanismos endógenos preexistentes dirigidos a suprimir respuestas de inflamación crónica. En un aspecto, se proporcionan composiciones y procedimientos para el tratamiento de la inflamación del tracto gastrointestinal.

Un aspecto se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta antiinflamatoria en una célula o tejido mediante la administración de una cantidad eficaz de un complejo antígeno-MHC-nanopartícula; en el que el antígeno es un antígeno derivado de un microbio que reside dentro o infecta el tracto gastrointestinal o es un antígeno asociado al tracto GI. También se proporciona un complejo antígeno-MHC-nanopartícula para su uso en la inducción de una respuesta antiinflamatoria en una célula o tejido, en el que el antígeno es un antígeno derivado de un microbio que reside dentro o infecta el tracto gastrointestinal o es un antígeno asociado al tracto GI. También se proporciona el uso de un complejo antígeno-MHC-nanopartícula en la fabricación de un medicamento útil para inducir una respuesta antiinflamatoria en una célula o tejido, en el que el antígeno es un antígeno derivado de un microbio que reside dentro o infecta el tracto gastrointestinal o es un antígeno asociado al tracto GI.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para el tratamiento de la inflamación en un paciente que lo necesite mediante la administración de una cantidad eficaz de un complejo antígeno-MHC-nanopartícula; en el que el antígeno es un antígeno derivado de un microbio que reside dentro o infecta el tracto gastrointestinal o es un antígeno asociado al tracto GI. También se proporciona un complejo antígeno-MHC-nanopartícula para su uso en el tratamiento de la inflamación en un paciente que lo necesite, en el que el antígeno es un antígeno derivado de un microbio que reside dentro o infecta el tracto gastrointestinal o es un antígeno asociado al tracto GI. También se proporciona el uso de un complejo antígeno-MHC-nanopartícula en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la inflamación en el tracto gastrointestinal en un paciente que lo necesite, en el que el antígeno es un antígeno derivado de un microbio que reside dentro o infecta el tracto gastrointestinal o es un antígeno asociado al tracto GI.

En otro aspecto adicional, se proporciona un procedimiento para acumular células T antiinflamatorias en un paciente que lo necesite administrando una cantidad eficaz de un complejo antígeno-MHC-nanopartícula; en el que el antígeno es un antígeno derivado de un microbio que reside dentro o infecta el tracto gastrointestinal o es

un antígeno asociado al tracto GI. También se proporciona un complejo antígeno-MHC-nanopartícula para su uso en la acumulación de células T antiinflamatorias en un paciente que lo necesite, en el que el antígeno es un antígeno derivado de un microbio que reside o infecta el tracto gastrointestinal o es un antígeno asociado al tracto GI. También se proporciona el uso de un complejo antígeno-MHC-nanopartícula en la fabricación de un medicamento útil para acumular células T antiinflamatorias en un paciente que lo necesite, en el que el antígeno es un antígeno derivado de un microbio que reside dentro o infecta el tracto gastrointestinal o es un antígeno asociado al tracto GI.

Otros aspectos se refieren a un complejo que comprende, que consiste esencialmente o aún más que consiste en, una nanopartícula, una proteína MHC y un antígeno derivado de un microbio que reside o infecta el tracto gastrointestinal o es un antígeno asociado al tracto GI. También se proporcionan composiciones que comprenden, que consisten esencialmente en, o aún más que consisten en, el antígeno-MHC-nanopartícula como se describe en la presente memoria descriptiva y un vehículo.

También se proporciona un kit que comprende, o alternativamente, que consiste esencialmente en, o aún más que consiste en, una composición como se describe en la presente memoria descriptiva e instrucciones para usar las composiciones para su propósito pretendido.

Descripción de los dibujos

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

Las **Figuras 1A-1C** demuestran que BaclYL se une a H-2K^d con alta afinidad y el complejo pMHC resultante se une a células T específicas de IGRP$_{206-214}$. **A**: Estabilización inducida por péptidos de moléculas K^d en células RMA-SK^d. TUM es un control positivo y Gp33 es un control negativo (unión a Db). **B** y **C**: los tetrámeros BaclYL/K^d se unen específicamente a las células T 8.3-CD8+, aunque con menor avidez que los tetrámeros NRP-V7/K^d.

Las **Figuras 2A-2D** muestran que BaclYL funciona como un antagonista en aislamiento, pero como un agonista parcial en presencia de LPS y su proteína donante es eficazmente presentada de forma cruzada por las células dendríticas. **A**: expresión de CD44 y CD69 en células T 8.3-CD8+ cultivadas en presencia de BaclYL, IGRP$_{206-214}$ (control positivo) o TUM (control negativo). **B**: ensayo de antagonismo. TUM se utiliza como control negativo. Obsérvese cómo las concentraciones crecientes de BaclYL (pero no de TUM, un control negativo que se une a K^d) antagonizan las respuestas de células T 8.3-CD8+ inducidas por IGRP$_{206-214}$ (secreción de IFNg, arriba; y proliferación, abajo). **C**: BaclYL funciona como un agonista en presencia de LPS. NTG, no transgénico (células T CD8+). **D**: las DC pueden procesar epítopos similares a BaclYL o BACIGRP$_{206-214}$ a partir de integrasa recombinante de tipo salvaje o integrasa mutante recombinante (donde el epítopo BaclYL está mutado para codificar IGRP$_{206-214}$).

Las **Figuras 3A-3D** muestran que el péptido BaclYL induce la formación de células T CD8+ en la memoria *in vitro*. **A** y **B**: Fenotipo de células T 8.3-CD8+ 28 días después del cultivo en presencia de DC pulsadas con péptido (10 o 0,001 µg/ml). Las células T 17.6-CD8+ son células T CD8+ específicas de IGRP$_{206-214}$ de muy baja avidez; como se esperaba, permanecen vírgenes después de 28 días en cultivo con BaclYL. C, contenido intracelular de IFNγ en respuesta a la exposición a péptidos. Las células T 8.3-CD8+ cultivadas con BaclYL producen rápidamente IFNγ en respuesta a la estimulación IGRP$_{206-214}$. D, secreción de IFNγ por, y proliferación de células T 8.3-CD8+ de tipo memoria (inducidas por BaclYL) en respuesta a la exposición a péptidos.

Las **Figuras 4A-4H** muestran que una respuesta de células T CD8+ reactivas a BaclYL$_{36-44}$ proporciona protección contra la colitis inducida por DSS. **A** y **B** muestran curvas de peso (**A**) y puntajes de actividad de la enfermedad (**B**) de 8.3-NOD, 17.6-NOD tras el tratamiento con DSS frente a ratones no tratados. Las **Figuras C y D** muestran curvas de peso (**C**) y puntajes de actividad de la enfermedad (**D**) de ratones 8.3-NOD frente a Itgβ7$^{-/-}$ 8.3-NOD tras el tratamiento con DSS. Las **Figuras E y F** muestran las curvas de supervivencia para los ratones estudiados en **A-D**. La **Figura G** demuestra que IGRP$_{206-214}^{-/-}$ NOD, pero no los ratones NOD son resistentes a la pérdida de peso en respuesta a la colitis inducida por DSS al 4%. La **Figura H** muestra que la transferencia adoptiva de CD8+ CTL con reacción cruzada a BaclYL$_{36-44}$ a ratones IGRP$_{206-214}^{-/-}$NOD dio como resultado una reducción significativa de los puntajes de actividad de la enfermedad en comparación con sus homólogos no transfundidos con CTL.

Las **Figuras 5A-5B** muestran que CTL CD8+ reactiva a BaclYL$_{36-44}$ protege a los ratones 17.6-NOD de la colitis inducida por DSS. La **Figura 5A** muestra curvas de peso, y la **Figura 5B** muestra los puntajes de actividad de la enfermedad en ratones 17.6-NOD en respuesta al tratamiento con DSS más la transferencia

de 8.3-CTL, al tratamiento con DSS solo, y a ningún tratamiento en absoluto. Obsérvese cómo la transferencia adoptiva de CD8+ CTL con reacción cruzada a BaclYL$_{36-44}$ a BaclYL$_{36-44}$ a ratones 17.6-NOD redujo significativamente los puntajes de actividad de la enfermedad y la pérdida de peso en respuesta al tratamiento con DSS, en comparación con sus contrapartes no transfundidas con CTL.

La **Figura 6** demuestra el reclutamiento de células T CD4+ autorreguladoras de tipo Tr1 a tejido linfoide asociado al intestino en ratones NOD tratados con IGRP$_{4-22}$/I-A^{g7}-NP. Se muestran datos de dos ratones.

La **Figura 7** representa un mapa de BacInt$_{40-54}$-I-Ab-C-Jun en pMT/V5. El constructo de ADN entre los sitios Nco I (854) a Xho I (1738) codifica la proteína de fusión HA-BacInt$_{40-54}$-I-Abeta (b)-C-Jun (293 a.a.). La proteína de fusión incluye secuencia líder 15 a.a. HA seguida por el péptido BacInt$_{40-54}$ (TNV) (15 a.a.). El péptido que codifica la secuencia de ADN se unió a I-Abeta (b) (199 a.a.) a través de un ligador GS de 16 a.a. El terminal C de I-Abeta (b) se unió a la secuencia C-Jun (40 a.a.,) a través de un ligador GS de 8 a.a. a.a. = aminoácido.

La **Figura 8** muestra las secuencias de proteínas y ADN del constructo BacInt$_{40-54}$-I-Abeta (b)-C-Jun. Las secuencias de componentes individuales en la proteína de fusión son líder HA (subrayado) seguido de la secuencia peptídica BacInt$_{40-54}$ (doble subrayado), I-Abeta (b) (subrayado punteado) y las secuencias C-Jun. Los ligadores GS no están resaltados.

La **Figura 9** representa un mapa de I-Aalpha (b)-C-Fos-BirA-His6 en pMT/V5. Los sitios del constructo de ADN que codifican la proteína de fusión HA líder-I-Aalpha (b)-C-Fos-BirA-His X 6 (284 a.a.) se clonaron en el vector de expresión de células de mosca pMT/V5 entre Nco I (854) y Xba I (1711). La proteína de fusión incluye I-Aalpha (d) (195 a.a.), seguido de C-Fos a través de un ligador GS (6 a.a.), y luego la secuencia BirA y 6 X His.

La **Figura 10** muestra las secuencias de proteínas y ADN del constructo I-Aalpha (b)-C-Fos. Las secuencias de componentes individuales en la proteína de fusión son HA líder (subrayado) seguido de I-Aalpha (b) (doble subrayado), C-Fos (subrayado punteado), BirA (sombreado) y las secuencias 6 X His. Los ligadores GS no están resaltados.

La **Figura 11** representa un mapa de BacInt$_{81-95}$-I-Ab-C-Jun en pMT/V5. El constructo de ADN entre los sitios Nco I (854) a Xho I (1738) codifica la proteína de fusión HA-BacInt$_{81-95}$-I-Abeta (b)-C-Jun (293 a.a.). La proteína de fusión incluye secuencia líder 15 a.a. HA seguida por el péptido BacInt$_{81-95}$ (LGY) (15 a.a.). El péptido que codifica la secuencia de ADN se unió a I-Abeta (b) (199 a.a.) a través de un ligador GS de 16 a.a. El terminal C de I-Abeta (b) se unió a la secuencia C-Jun (40 a.a.,) a través de un ligador GS de 8 a.a.

La **Figura 12** muestra las secuencias de proteínas y ADN del constructo BacInt$_{81-95}$-I-Abeta (b)-C-Jun. Las secuencias de los componentes individuales en la proteína de fusión son líder HA (subrayado) seguido de la secuencia peptídica BacInt$_{81-95}$ (doble subrayado), I-Abeta (b) (subrayado punteado) y secuencias C-Jun (sombreadas). Los ligadores GS no están resaltados.

La **Figura 13** representa un mapa de BacInt$_{365-379}$-I-Ab-C-Jun en pMT/V5. El constructo de ADN entre los sitios Nco I (854) a Xho I (1738) codifica la proteína de fusión HA-BacInt$_{365-379}$-I-Abeta (b)-C-Jun (293 a.a.). La proteína de fusión incluye secuencia líder 15 a.a. HA seguida de péptido BacInt$_{365-379}$ (TQI) (15 a.a.). El péptido que codifica la secuencia de ADN se unió a I-Abeta (b) (199 a.a.) a través de un ligador GS de 16 a.a. El terminal C de I-Abeta (b) se unió a la secuencia C-Jun (40 a.a.,) a través de un ligador GS de 8 a.a.

La **Figura 14** muestra las secuencias de proteínas y ADN del constructo BacInt$_{365-379}$-I-Abeta (b)-C-Jun. Las secuencias de los componentes individuales en la proteína de fusión son líder HA (subrayado) seguido de la secuencia peptídica BacInt$_{365-379}$ (doble subrayado), I-Abeta (b) (subrayado punteado) y secuencias C-Jun (sombreadas). Los ligadores GS no están resaltados.

La **Figura 15** representa un mapa de BacInt$_{57-71}$-I-Ab-C-Jun en pMT/V5. El constructo de ADN entre los sitios Nco I (854) a Xho I (1738) codifica la proteína de fusión HA-BacInt$_{57-71}$-I-Abeta (b)-C-Jun (293 a.a.). La proteína de fusión incluye secuencia líder 15 a.a. HA seguida por el péptido BacInt$_{57-71}$ (INH) (15 a.a.). El péptido que codifica la secuencia de ADN se unió a I-Abeta (b) (199 a.a.) a través de un ligador GS de 16 a.a. El terminal C de I-Abeta (b) se unió a la secuencia C-Jun (40 a.a.,) a través de un ligador GS de 8 a.a.

La **Figura 16** muestra las secuencias de proteína y ADN del constructo BacInt$_{57-71}$-I-Abeta (b)-C-Jun. Se destacan las secuencias de componentes individuales en la proteína de fusión: líder HA (subrayado) seguido de la secuencia peptídica BacInt$_{57-71}$ (doble subrayado), I-Abeta (b) (subrayado punteado) y secuencias C-Jun (sombreadas). Los ligadores GS no están resaltados.

La **Figura 17** representa un mapa de BacInt$_{88-102}$-I-Ab-C-Jun en pMT/V5. El constructo de ADN entre los

sitios Nco I (854) a Xho I (1738) codifica la proteína de fusión HA-BacInt$_{88-102}$-I-Abeta (b)-C-Jun (293 a.a.). La proteína de fusión incluye secuencia líder 15 a.a. HA seguida por el péptido BacInt$_{88-102}$ (IPA) (15 a.a.). El péptido que codifica la secuencia de ADN se unió a I-Abeta (b) (199 a.a.) a través de un ligador GS de 16 a.a. El terminal C de I-Abeta (b) se unió a la secuencia C-Jun (40 a.a.,) a través de un ligador GS de 8 a.a.

La **Figura 18** muestra las secuencias de proteínas y ADN del constructo BacInt$_{88-102}$-I-Abeta (b)-C-Jun. Las secuencias de componentes individuales en la proteína de fusión se destacan: líder HA (subrayado) seguido de la secuencia peptídica BacInt$_{88-102}$ (doble subrayado), I-Abeta (b) (subrayado punteado) y secuencias C-Jun (sombreadas). Los ligadores GS no están resaltados.

La **Figura 19** muestra una imagen TEM representativa de NP de oro recubiertos con pMHC (~14 nm) concentrados a altas densidades (~5×10^{13}/ml) y monodispersados. Mag: 50.000X.

La **Figura 20** muestra los efectos de la dosis de pMHC (GNP) y la valencia de pMHC sobre las propiedades agonistas de las GNP recubiertos con pMHC. La Figura compara las cantidades de IFNγ secretadas por las células T 8.3-CD8+ afines en respuesta a dos muestras diferentes de pMHC-GNP (ambas compuestas por ~2×10^{13} GNP de 14 nm de diámetro/ml). Au-022410 y Au-21910 portaban ~250 y ~120 pMHCs/GNP, respectivamente. Au-011810-C llevaba ~120 pMHC/GNP de control.

La **Figura 21** demuestra la secreción de IFNγ inducida por pMHC-NP por las células T 8.3-CD8+ en función de la valencia de pMHC. Las células T 8.3-CD8+ (2,5×105 células/ml) se cultivaron con números crecientes de NP recubiertos con tres valencias diferentes IGRP$_{206-214}$/K^d.

La **Figura 22** muestra que la actividad agonista más baja de pMHC-NP se puede compensar aumentando la densidad de pMHC-NP pero solo por encima de un umbral de valencia de pMHC. El gráfico compara la actividad agonista de tres preparaciones diferentes de pMHC-NP (que llevan tres valencias diferentes de pMHC) en un intervalo de densidades de NP. Tenga en cuenta que las NP que llevan 8 pMHC, a diferencia de las que llevan 11 pMHC, no pueden desencadenar adecuadamente la secreción de IFNγ incluso a altas densidades de pMHC-NP, en comparación con las NP que llevan 54 pMHC.

La **Figura 23** muestra los efectos del umbral de valencia de pMHC sobre las propiedades agonistas de pMHC-NP en función de la entrada total de pMHC.

La **Figura 24** muestra los efectos de la valencia de pMHC sobre la actividad agonista de los pMHC-NP producidos con núcleos NP de óxido de hierro más grandes.

La **Figura 25** muestra el efecto del tamaño sobre la actividad agonista. Au-0224-15 eran GNP de 14 nm recubiertos con una valencia de pMHC relativamente baja pero preparados a una alta densidad; Au-0323-40 eran GNP de 40 nm recubiertos con alta valencia de pMHC pero a baja densidad. Au-0224-15 tuvo una actividad agonista superior a la muestra Au-0323-40.

La **Figura 26** muestra el efecto de los PEG protectores sobre la función de los pMHC-GNP. Au-021910 consistió en ~2×10^{13} GNP de 14 nm de diámetro/ml protegido por tiol-PEG 2 kD y recubierto con ~120 pMHC/GNP. Las GNP de Au-012810 (también ~2×10^{13} GNP de 14 nm/ml) se protegieron con tiol-PEG de 5 kD y se recubrieron con ~175 pMHC/GNP. La muestra Au-021910 tenía una actividad agonista superior.

La **Figura 27** muestra la expansión eficiente de células T CD8+ reactivas con NRP-V7 por NP de oro recubiertas con NRP-V7/Kd. Se utilizaron 3 × 10^{12} NP (~10 nm de tamaño) que llevaban 25 µg de pMHC (150 pMHC/NP). Se trataron ratones NOD pre-diabéticos de 10 semanas de edad con dos inyecciones semanales de NP de oro recubiertas con NRP-V7/kd durante 5 semanas. El tetrámero TUM/Kd es un control negativo. Cada columna de paneles corresponde a un ratón diferente.

La **Figura 28** representa la gran expansión de células T CD8+ afines en ratones tratados con NP recubiertas con pMHC. Se usaron 3 × 10^{12} IGRP$_{206-214}$/K^d -NP (~10 nm de tamaño) con 25 µg de pMHC (150 pMHC/NP). Panel superior: perfil de un ratón sacrificado después de 4 dosis. Panel inferior: perfil de dos ratones diferentes después de 10 inyecciones (solo sangre; vivo en el momento de la presentación de la presente solicitud).

Descripción detallada

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

Debe observarse que, como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a "un excipiente" incluye una pluralidad de excipientes.

I. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Como se usa en la presente memoria descriptiva, los siguientes términos tienen los siguientes significados.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "que comprende" o "comprende" significa que las composiciones y los procedimientos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros. "Que consiste esencialmente en" cuando se usa para definir composiciones y procedimientos, significará excluir otros elementos de cualquier significado esencial para la combinación para el propósito establecido. Por lo tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se define en la presente memoria descriptiva no excluiría otros materiales o etapas que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la invención reivindicada, tales como la capacidad de tratar la enfermedad inflamatoria intestinal en un sujeto que necesita dicho tratamiento y/o de inducir una respuesta antiinflamatoria. "Que consiste en" deberá significar que excluye más elementos traza que de otros ingredientes y etapas sustanciales del procedimiento. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de la presente invención.

Por "biocompatible", se entiende que los componentes del sistema de administración no causarán daño tisular o daño al sistema biológico humano. Para impartir biocompatibilidad, se utilizarán preferentemente polímeros y excipientes que hayan tenido un historial de uso seguro en seres humanos o con el estado GRAS (generalmente aceptado como seguro). Por biocompatibilidad, se entiende que los ingredientes y excipientes utilizados en la composición serán finalmente "bioabsorbidos" o eliminados por el cuerpo sin efectos adversos para el cuerpo. Para que una composición sea biocompatible y se considere no tóxica, no debe causar toxicidad en las células. De manera similar, el término "bioabsorbible" se refiere a nanopartículas hechas de materiales que sufren bioabsorción *in vivo* durante un período de tiempo tal que se evite la acumulación a largo plazo del material en el paciente. En una realización preferente, la nanopartícula biocompatible se bioabsorbe durante un período de menos de 2 años, preferentemente menos de 1 año y aún más preferentemente menos de 6 meses. La tasa de bioabsorción está relacionada con el tamaño de la partícula, el material utilizado y otros factores bien reconocidos por el experto en la técnica. Se puede usar una mezcla de materiales bioabsorbibles y biocompatibles para formar las nanopartículas usadas en la presente invención. En una realización, se pueden combinar óxido de hierro y un polímero bioabsorbible biocompatible. Por ejemplo, el óxido de hierro y el PGLA se pueden combinar para formar una nanopartícula

Un complejo antígeno-MHC-nanoesfera se refiere a la presentación de un péptido, carbohidrato, lípido u otro segmento, fragmento o epítopo antigénico de una molécula o proteína antigénica (es decir, péptido o autoantígeno) en una superficie, tal como una nanoesfera biodegradable biocompatible. "Antígeno", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a todo, parte, fragmento o segmento de una molécula que puede inducir una respuesta inmune en un sujeto o una expansión de células antipatógenas.

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

Una "imitación" es un análogo de un ligando o péptido dado, en el que el análogo es sustancialmente similar al ligando. "Sustancialmente similar" significa que el análogo tiene un perfil de unión similar al ligando, excepto que la imitación tiene uno o más grupos funcionales o modificaciones que en conjunto representan menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos que aproximadamente el 20%, menos que aproximadamente el 10% o menos que aproximadamente el 5% del peso molecular del ligando.

El término "célula inmune" se refiere a una célula del sistema inmunitario. Las células del sistema inmunitario incluyen, por ejemplo, esplenocitos adultos, linfocitos T, linfocitos B y células de origen de médula ósea, como las células presentadoras de antígeno de un mamífero, que tienen actividad hacia el organismo del que se deriva la célula inmune. También se incluyen células del sistema inmunitario innato, como, por ejemplo, células asesinas naturales, mastocitos, eosinófilos, basófilos y células fagocíticas, como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas.

El término "célula T antiinflamatoria" se refiere a una célula T que promueve una respuesta antiinflamatoria. La

función antiinflamatoria de las células T se puede lograr mediante la producción y/o secreción de proteínas antiinflamatorias, citocinas, quimiocinas y similares. Las proteínas antiinflamatorias también pretenden abarcar señales antiproliferativas que suprimen las respuestas inmunitarias. Las proteínas antiinflamatorias incluyen IL-4, IL-10, IL-13, IFN-α, TGF-β, IL-1ra, G-CSF y receptores solubles para TNF e IL-6. También se incluyen células antiinflamatorias que tienen un fenotipo inflamatorio pero que matan las células presentadoras de antígeno que orquestan una respuesta autoinmune particular. En ciertas realizaciones, estas células producen IFNγ y TNFα, entre otras citocinas. En ciertas realizaciones, la célula T antiinflamatoria es aquella que reconoce el epítopo bacteriano intestinal con baja avidez. En realizaciones adicionales, la célula T antiinflamatoria es una célula T citotóxica.

El término "IL-10" o "Interleucina-10" se refiere a una citocina codificada por el gen IL-10. La secuencia de IL-10 está representada por el número de Acceso del GenBank: NM_000572.2 (ARNm) y NP_000563.1 (proteína).

El término "TGF-β" o "factor de crecimiento transformante beta" se refiere a una proteína que puede tener un efecto antiinflamatorio. TGF-β es una proteína secretada que existe en al menos tres isoformas llamadas TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3. También fue el nombre original de TGF-β1, que fue el miembro fundador de esta familia. La familia TGF-β es parte de una superfamilia de proteínas conocida como la superfamilia beta del factor de crecimiento transformante, que incluye inhibinas, activina, hormona antimulleriana, proteína morfogenética ósea, decapentapléjico y Vg-1.

El término "tracto gastrointestinal" se refiere tanto al tracto gastrointestinal superior como al inferior. El tracto gastrointestinal superior consta del esófago, el estómago y el duodeno. El tracto gastrointestinal inferior incluye el intestino delgado y el intestino grueso.

El término "microbio" se refiere a un organismo microscópico unicelular. Los microorganismos incluyen, por ejemplo, bacterias, hongos, arqueas y protistas.

Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para lograr el propósito pretendido, ejemplos no limitativos de los mismos incluyen: iniciación de la respuesta inmune, modulación de la respuesta inmune, supresión de una respuesta inflamatoria y modulación de la actividad de las células T o poblaciones de células T. En un aspecto, la cantidad eficaz es aquella que funciona para lograr un propósito terapéutico establecido, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz. Como se describe en detalle en la presente memoria descriptiva, la cantidad eficaz, o dosis, depende del propósito y la composición, componente y puede determinarse de acuerdo con la presente divulgación.

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

El término "integrasa" se refiere a una proteína expresada en *Bacteroides*. El número de Acceso del GenBank correspondiente a la secuencia de Integrasa es YP_001300081.1. Esta secuencia está representada por la SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 3 representa una secuencia de ADN codificante de Integrasa. La SEQ ID NO: 1 corresponde a un epítopo en la proteína integrasa. Este epítopo es IYLKTNVYL (SEQ ID NO: 1). Las cepas de *Bacteroides* que se sabe que tienen el epítopo IYLKTNVYL (SEQ ID NO: 1) incluyen, por ejemplo, Bacteroides sp. 9_1_42FAA, Bacteroides sp. D4, Bacteroides sp. 3_1_33FAA, Bacteroides dorei 5_1_36/D4, Bacteroides dorei DSM 17855, Bacteroides vulgatus ATCC 8482, Bacteroides sp. 4_3_47FAA, Bacteroides vulgatus PC510.

Por "nanoesfera", "NP" o "nanopartícula", en la presente memoria descriptiva, se entiende una pequeña partícula discreta que se administra de forma singular o plural a un sujeto, muestra celular o muestra de tejido según sea apropiado. En ciertas realizaciones, las nanoesferas tienen una forma sustancialmente esférica. El término "sustancialmente esférico", como se usa en la presente memoria descriptiva, significa que la forma de las partículas no se desvía de una esfera en más de aproximadamente 10%. En ciertas realizaciones, la nanopartícula no es un liposoma o una partícula viral. En realizaciones adicionales, la nanopartícula es sólida. Se pueden aplicar diversos complejos de antígeno o péptido conocidos de la invención a las partículas. Las nanoesferas de la presente invención varían en tamaño de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1 µm y, preferentemente, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 1 µm y en algunos aspectos se refiere al diámetro promedio o mediano de una pluralidad de nanoesferas cuando hay una pluralidad de nanoesferas destinado a. Se pueden obtener partículas de tamaño nanométrico más pequeñas, por ejemplo, mediante el procedimiento de fraccionamiento mediante el cual las partículas más grandes se dejan sedimentar en una solución acuosa. La porción superior de la solución se recupera luego por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Esta porción superior está enriquecida en partículas de menor tamaño. El procedimiento puede repetirse hasta que se genere un tamaño promedio deseado.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refieren solo a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación

respalda una definición que se refiere solo a alternativas e "y/o".

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la frase "respuesta inmune" o su "respuesta inmunológica" equivalente se refiere al desarrollo de una respuesta mediada por células (mediada por células T específicas de antígeno o sus productos de secreción) dirigida contra microbios específicos del tracto gastrointestinal antígenos o un epítopo relacionado de antígenos específicos para microbios del tracto gastrointestinal. La presentación de epítopos de polipéptidos en asociación con moléculas de MHC de clase I o clase II provoca una respuesta inmune celular para activar las células T auxiliares $CD4^+$ específicas de antígeno y/o las células T citotóxicas CD8+. La respuesta también puede implicar la activación de otros componentes.

Los términos "respuesta inflamatoria" e "inflamación" tal como se usan en la presente memoria descriptiva indican la respuesta biológica compleja de los tejidos vasculares de un individuo a estímulos dañinos, tales como patógenos, células dañadas o irritantes, e incluye la secreción de citocinas y más particularmente de citocinas proinflamatorias, es decir, citocinas que se producen predominantemente por células inmunes activadas y están involucradas en la amplificación de reacciones inflamatorias. Los ejemplos de citocinas proinflamatorias incluyen, pero sin limitación, IL-1, IL-6, TNF-a, IL-17, IL21, IL23 y TGF-β. Las inflamaciones a modo de ejemplo incluyen inflamación aguda e inflamación crónica. La inflamación aguda indica un procedimiento a corto plazo caracterizado por los signos clásicos de inflamación (hinchazón, enrojecimiento, dolor, calor y pérdida de función) debido a la infiltración de los tejidos por el plasma y los leucocitos. Una inflamación aguda generalmente ocurre mientras el estímulo nocivo está presente y cesa una vez que el estímulo ha sido eliminado, descompuesto o tapiado por cicatrices (fibrosis). La inflamación crónica indica una afección caracterizada por inflamación activa concurrente, destrucción de tejidos e intentos de reparación. La inflamación crónica no se caracteriza por los signos clásicos de inflamación aguda mencionados anteriormente. En cambio, el tejido inflamado crónicamente se caracteriza por la infiltración de células inmunes mononucleares (monocitos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas), destrucción de tejidos e intentos de curación, que incluyen angiogénesis y fibrosis. Una inflamación puede inhibirse en el sentido de la presente divulgación al afectar y en particular inhibir cualquiera de los eventos que forman la respuesta biológica compleja asociada con una inflamación en un individuo.

Los términos "epítopo" y "determinante antigénico" se usan indistintamente para referirse a un sitio en un antígeno al que las células B y/o T responden o reconocen. Los epítopos de células B se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen usualmente en la exposición a solventes desnaturalizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario se pierden usualmente en el tratamiento con solventes desnaturalizantes. Un epítopo usualmente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los procedimientos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Glenn E. Morris, Epitope Mapping Protocols [Protocolos de mapeo de epítopos] (1996). Las células T reconocen epítopos continuos de aproximadamente nueve aminoácidos para las células CD8 o aproximadamente 13-15 aminoácidos para las células CD4. Las células T que reconocen el epítopo pueden identificarse mediante ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígeno, según lo determinado por la incorporación de ^{3}H-timidina por células T cebadas en respuesta a un epítopo (Burke et al., J. Inf. Dis., 170: 1110-1119, 1994), por destrucción dependiente de antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos, Tigges et al., J. Immunol., 156 (10):3901-3910, 1996) o por secreción de citocinas. La presencia de una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse mediante ensayos de proliferación (células T CD4+) o ensayos CTL (linfocitos T citotóxicos).

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

Como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos "paciente" y "sujeto" se usan como sinónimos y se refieren a un mamífero. En algunas realizaciones, el paciente es un ser humano. En otras realizaciones, el paciente o sujeto es un mamífero comúnmente usado en un laboratorio tal como un ratón, rata, simio, canino, felino, bovino, equino u ovino.

Como se usa en la presente solicitud, el término "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es recombinante o se ha aislado sin ácido nucleico genómico total. Dentro del término "polinucleótido" se incluyen oligonucleótidos (ácidos nucleicos de 100 residuos o menos de longitud), vectores recombinantes, que incluyen, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus y similares. Los polinucleótidos incluyen, en ciertos aspectos, secuencias reguladoras, aisladas sustancialmente lejos de sus genes naturales o secuencias codificantes de proteínas. Los polinucleótidos pueden ser ARN, ADN, análogos de los mismos o una combinación de los mismos. Un ácido nucleico que codifica todo o parte de un polipéptido puede contener una secuencia contigua de ácido nucleico que codifica todo o una porción de dicho polipéptido de las siguientes longitudes: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650,

660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1095, 1100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 9000, 10000 o más nucleótidos, nucleósidos o pares de bases. También se contempla que un polipéptido particular de una especie dada puede estar codificado por ácidos nucleicos que contienen variaciones naturales que tienen secuencias de ácido nucleico ligeramente diferentes, sin embargo, codifican la misma proteína, polipéptido o péptido sustancialmente similar.

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

El término "aislado" o "recombinante" como se usa en la presente memoria descriptiva con respecto a los ácidos nucleicos, tales como ADN o ARN, se refiere a moléculas separadas de otros ADN o ARN, respectivamente, que también están presentes en la fuente natural de la macromolécula como polipéptidos El término "ácido nucleico aislado o recombinante" pretende incluir fragmentos de ácido nucleico de origen no natural como fragmentos y no se encontrarían en el estado natural. El término "aislado" también se usa en la presente memoria descriptiva para referirse a polinucleótidos, polipéptidos y proteínas que están aislados de otras proteínas celulares y está destinado a abarcar tanto polipéptidos purificados como recombinantes. En otras realizaciones, el término "aislado o recombinante" significa separado de constituyentes, celulares y de otro tipo, en los que la célula, tejido, polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento(s) de los mismos, que normalmente están asociados en la naturaleza. Por ejemplo, una célula aislada es una célula que está separada del tejido o células de fenotipo o genotipo diferente. Un polinucleótido aislado se separa de los nucleótidos contiguos 3' y 5' con los que normalmente está asociado en su entorno nativo o natural, por ejemplo, en el cromosoma. Como es evidente para los expertos en la técnica, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento(s) de origen no natural no requiere "aislamiento" para distinguirlo de su contraparte de origen natural.

Una región polinucleotídica o polinucleotídica (o un polipéptido o región polipeptídica) que tiene un cierto porcentaje (por ejemplo, 80%, 85%, 90% o 95%) de "identidad de secuencia" con otra secuencia significa que, cuando está alineado, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son iguales al comparar las dos secuencias. La alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar utilizando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en Current Protocols in Molecular Biology [Protocolos actuales en biología molecular] (Ausubel et al., Eds. 1987) Suplemento 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1. Preferentemente, los parámetros predeterminados se usan para la alineación. Un programa de alineación preferente es BLAST, que utiliza parámetros predeterminados. En particular, los programas preferentes son BLASTN y BLASTP, que utilizan los siguientes parámetros predeterminados: Código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambos; corte = 60; espera = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenar por = PUNTAJE ALTO; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + Traducciones de CDS GenBank + SwissProtein + SPupdate + PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente dirección de Internet: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST.

Se debe inferir sin una recitación explícita y, a menos que se pretenda lo contrario, que cuando la presente invención se refiere a un polipéptido, proteína, polinucleótido o anticuerpo, se pretende un equivalente o biológicamente equivalente dentro del alcance de la presente invención. Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "equivalente biológico del mismo" pretende ser sinónimo de "equivalente del mismo" cuando se refiere a una proteína, anticuerpo, fragmento, polipéptido o ácido nucleico de referencia, pretende aquellos que tienen una homología mínima mientras mantienen la estructura o funcionalidad deseada. A menos que se mencione específicamente en la presente memoria descriptiva, se contempla que cualquier polinucleótido, polipéptido o proteína mencionado en la presente memoria descriptiva también incluya sus equivalentes. En un aspecto, un polinucleótido equivalente es aquel que se hibrida en condiciones estrictas con el polinucleótido o complemento del polinucleótido como se describe en la presente memoria descriptiva para su uso en los procedimientos descritos. En otro aspecto, un anticuerpo equivalente o polipéptido de unión a antígeno pretende uno que se una con al menos 70%, o alternativamente al menos 75%, o alternativamente al menos 80%, o alternativamente al menos 85%, o alternativamente al menos 90%, o alternativamente, al menos 95% de afinidad o una mayor afinidad por un anticuerpo de referencia o fragmento de unión a antígeno. En otro aspecto, el equivalente del mismo compite con la unión del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno a su antígeno bajo un ensayo ELISA competitivo. En otro aspecto, un equivalente pretende al menos aproximadamente el 80% de homología o identidad y, alternativamente, al menos aproximadamente el 85%, o alternativamente al menos aproximadamente el 90%, o alternativamente al menos aproximadamente el 95%, o alternativamente el 98% de homología o identidad y exhibe actividad biológica sustancialmente equivalente a la proteína de referencia, polipéptido o ácido nucleico.

La "hibridación" se refiere a una reacción en la que uno o más polinucleótidos reaccionan para formar un complejo que se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno entre las bases de los residuos de nucleótidos. El enlace de hidrógeno puede ocurrir mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick, la unión de Hoogstein o de cualquier otra manera específica de secuencia. El complejo puede comprender dos hebras que forman una estructura dúplex, tres o más hebras que forman un complejo multicatenario, una hebra autohibridante individual o cualquier combinación de estos. Una reacción de hibridación puede constituir una etapa en un procedimiento más extenso, como el inicio de una reacción de PC o la escisión enzimática de un polinucleótido por una ribozima.

Los ejemplos de condiciones de hibridación rigurosas incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C; concentraciones de tampón de hibridación de aproximadamente 6x SSC a aproximadamente 10x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 0% a aproximadamente 25%; y soluciones de lavado de aproximadamente 4x SSC a aproximadamente 8x SSC. Los ejemplos de condiciones de hibridación moderadas incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C; concentraciones de tampón de aproximadamente 9x SSC a aproximadamente 2x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 30% a aproximadamente 50%; y soluciones de lavado de aproximadamente 5x SSC a aproximadamente 2x SSC. Los ejemplos de condiciones de alta rigurosidad incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 68 °C; concentraciones de tampón de aproximadamente 1x SSC a aproximadamente 0.1x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 55% a aproximadamente 75%; y soluciones de lavado de aproximadamente 1x SSC, 0.1x SSC o agua desionizada. En general, los tiempos de incubación e hibridación son de 5 minutos a 24 horas, con 1, 2 o más etapas de lavado, y los tiempos de incubación de lavado son de aproximadamente 1, 2 o 15 minutos. SSC es NaCl 0,15 M y tampón citrato 15 mM. Se entiende que se pueden emplear equivalentes de SSC que usan otros sistemas tampón.

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

La "homología" o la "identidad" o la "similitud" también pueden referirse a dos moléculas de ácido nucleico que se hibridan en condiciones rigurosas.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos "tratar", "tratamiento" y similares se usan en la presente memoria descriptiva para significar obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente un trastorno o signo o síntoma del mismo, y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de un trastorno y/o efecto adverso atribuible al trastorno. En un aspecto, el tratamiento indica una reducción en la inflamación en un paciente. Los procedimientos para medir tales incluyen, entre otros, la vasodilatación, la producción de marcadores de inflamación y el cese de la infiltración de leucocitos. Los marcadores de inflamación incluyen, por ejemplo, IL-6, IL-8, IL-18, TNF-alfa y CRP. Cualquier procedimiento apropiado para medir y controlar dichos marcadores se conoce en la técnica.

Prevenir tiene la intención de prevenir un trastorno o efecto *in vitro* o *in vivo* en un sistema o sujeto que está predispuesto al trastorno o efecto.

Una "composición" pretende significar una combinación de agente activo y otro compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente o marcador detectable) o activo, tal como un adyuvante.

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

El término "codón funcionalmente equivalente" se usa en la presente memoria descriptiva para referirse a codones que codifican el mismo aminoácido, tales como los seis codones para arginina o serina, y también se refiere a codones que codifican aminoácidos biológicamente equivalentes (consulte la Tabla siguiente).

Tabla de Codones

Aminoácidos			**Codones**
Alanina	Ala	A	GCA GCC GCG GCU

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

Como se usa en la presente memoria descriptiva, una "proteína" o "polipéptido" o "péptido" se refiere a una molécula que comprende al menos cinco residuos de aminoácidos.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se proporcionan únicamente a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica de la presente divulgación detallada.

Realizaciones descriptivas

Anteriormente se desconocía que los péptidos antigénicos de las bacterias simbióticas del tracto gastrointestinal eran específicamente reconocidos por las células T del huésped endógeno al ser procesadas por células presentadoras de antígenos (APC, como las células dendríticas o DC) profesionales, y que esta interacción dirigida por antígenos entre una célula T afín y la APC puede inhibir la IBD. Sin limitarse a la teoría, los solicitantes creen que las proteínas de las bacterias que residen o infectan el tracto gastrointestinal son procesadas por el proteasoma o en el endosoma y los péptidos resultantes se transportan al retículo endoplásmico para unirse a las moléculas endógenas de MHC de clase I o clase II, que luego se transportan a la membrana plasmática de la APC, que luego activa las células T afines.

Los solicitantes creen que esta es la primera divulgación de que los antígenos de las bacterias gastrointestinales asociadas se procesan y presentan ante las células T endógenas afines con la capacidad de suprimir la enfermedad inflamatoria intestinal, y por lo tanto, los solicitantes creen que estos antígenos podrían usarse como un objetivo para fomentar el reclutamiento y la acumulación de células T autorreguladoras (antiinflamatorias) para, por ejemplo, el intestino en la enfermedad inflamatoria intestinal. Se ha demostrado previamente que los complejos antígeno-MHC-nanopartícula expanden las poblaciones terapéuticas de células T en otras enfermedades (consulte, por ejemplo, la publicación de patente de U.S. N.º 2009/0155292), pero se desconocía que esta tecnología podría suprimir la inflamación, por ejemplo, el tracto gastrointestinal o tratar enfermedades inflamatorias del intestino. Las composiciones y procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva son útiles para la supresión de la inflamación y para el tratamiento de enfermedades asociadas con la misma.

II. Procedimientos

Los procedimientos como se describen en la presente memoria descriptiva comprenden, o alternativamente, consisten esencialmente en, o aún más consisten en la administración de una cantidad eficaz de un complejo antígeno-MHC-nanopartícula a una célula, tejido o sujeto para el propósito de uno o más de: (1) inducir una respuesta antiinflamatoria en una célula o tejido; (2) tratar o reducir la inflamación en un paciente que lo necesite; (3) acumular células T antiinflamatorias autorreguladoras en un paciente que lo necesite; y/o (4) transferir linfocitos T citotóxicos dirigidos a epítopos bacterianos intestinales en un paciente que lo necesite. En una realización, los linfocitos T citotóxicos reconocen el epítopo bacteriano intestinal con baja avidez.

En una realización, la inflamación del tracto gastrointestinal se reduce o se trata. Los procedimientos para determinar y controlar la terapia son conocidos en la técnica y se describen brevemente en la presente memoria descriptiva. Cuando se administra *in vitro*, la administración es mediante el contacto de la composición con el tejido o la célula mediante cualquier procedimiento apropiado, por ejemplo, mediante la administración a un medio de cultivo celular o tisular, y es útil como un filtro para determinar si la terapia es apropiada para un individuo o para terapias alternativas para ser utilizadas como un sustituto o en combinación con las composiciones descritas. Cuando se administra *in vivo*, la administración es por administración sistémica o local. *In vivo*, los procedimientos se pueden practicar en un animal no humano para seleccionar terapias alternativas para usar como un sustituto o en combinación con las composiciones descritas antes de la administración humana. En un mamífero humano o no humano, también son útiles para el tratamiento de la enfermedad o trastorno.

En ciertas realizaciones, el paciente a ser tratado por los procedimientos de la presente divulgación padece una enfermedad gastrointestinal que tiene como síntoma o condición de la inflamación del tejido GI. Los ejemplos no limitantes de enfermedades gastrointestinales incluyen enfermedad inflamatoria intestinal, colitis, enfermedad de Crohn, reacciones alérgicas en el tracto gastrointestinal, alergias alimentarias, enfermedades eosinofílicas en el sistema gastrointestinal, síndrome del intestino irritable, enfermedad celíaca y hemorragia gástrica. En una realización, la enfermedad se selecciona del grupo de: enfermedad inflamatoria intestinal, colitis, enfermedad de Crohn, inflamación alérgica del tracto gastrointestinal y enfermedad celíaca. En una realización relacionada, la enfermedad es enfermedad inflamatoria intestinal.

Los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva son útiles para inducir una respuesta antiinflamatoria en una célula o tejido. En una realización, la célula es una célula o tejido del tracto gastrointestinal. El tracto gastrointestinal superior consta del esófago, el estómago y el duodeno. La demarcación exacta entre "superior" y "inferior" puede variar. Tras una disección macroscópica, el duodeno puede parecer un órgano unificado, pero a menudo se divide en dos partes según la función, el suministro arterial o la embriología. El tracto gastrointestinal inferior incluye el intestino delgado y el intestino grueso. El intestino delgado tiene tres partes: el duodeno, el yeyuno y el íleon. En el duodeno, las enzimas digestivas del páncreas y la vesícula biliar (bilis) se mezclan. Las enzimas digestivas descomponen las proteínas y la bilis y emulsionan las grasas en micelas. El duodeno contiene glándulas de Brunner que producen bicarbonato y jugo pancreático que contiene bicarbonato para neutralizar el ácido clorhídrico del estómago. El yeyuno es la sección media del intestino, conectando el duodeno al íleon. Contiene los pliegues circulares y las vellosidades para aumentar el área de superficie de esa parte del tracto gastrointestinal. El íleon tiene vellosidades, en las que todas las moléculas solubles se absorben en la sangre (capilares y lácteos). El intestino grueso tiene tres partes: ciego, colon y recto. El apéndice vermiforme está unido al ciego. El colon incluye el colon ascendente, el colon transverso, el colon descendente y la flexión sigmoidea. La función principal del colon es absorber agua, pero también contiene bacterias que producen vitaminas beneficiosas.

En otra realización, la respuesta antiinflamatoria se induce en una célula o tejido inmune que contiene tal. Las células inmunes incluyen, por ejemplo, esplenocitos adultos, linfocitos T, linfocitos B y células de origen de médula ósea, tales como células presentadoras de antígeno defectuosas de un mamífero, que tienen actividad hacia el organismo del que se deriva la célula inmune.

El MHC del complejo antígeno-MHC-nanopartícula puede ser MHC I, MHC II o MHC no clásico. Las proteínas MHC se describen en la presente memoria descriptiva. En una realización, el MHC del complejo antígeno-MHC-nanopartícula es un MHC de clase I. En otra realización, el MHC es un MHC de clase II. En otras realizaciones, el componente MHC del complejo antígeno-MHC-nanopartícula es MHC clase II o una molécula MHC no clásica como se describe en la presente memoria descriptiva.

En uno de los aspectos del procedimiento, se proporciona un procedimiento para acumular células T antiinflamatorias (específicas para microbios intestinales o específicas para microbios gastrointestinales) en un paciente que las necesite. En una realización, las células T se acumulan en el tracto gastrointestinal del paciente. En otra realización, la célula T es una célula T CD8+ convencional que reconoce cualquier antígeno microbiano del tracto gastrointestinal. En una realización adicional, la célula T es una célula T CD8+ autorreguladora de tipo

memoria. En otra realización adicional, la célula T es una célula T CD4+. En una realización relacionada, la célula T secreta IL-10 o TGFβ.

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

III. Complejos antígeno-MHC-nanopartícula

Ciertos aspectos se refieren a procedimientos para producir medicamentos anti-IBD específicos de antígeno para el intestino que se dirigen específicamente a la inflamación intestinal sin comprometer la inmunidad sistémica. El ejemplo 2 describe la producción de complejos antígeno-MHC-nanopartícula. Los complejos antígeno-MHC-nanopartícula útiles en la presente invención comprenden un antígeno derivado de un microbio del tracto gastrointestinal. Se contempla que la administración de nanopartículas recubiertas con complejos antígeno-MHC específicos del intestino a un paciente dará como resultado una expansión de las células T específicas del antígeno intestinal circulante que son de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 90% del total de células T circulantes, o de aproximadamente 1% a aproximadamente 80%, o de aproximadamente 5% a aproximadamente 80%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 50%, o de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, o de aproximadamente 20% a aproximadamente 50%, o de aproximadamente 30% a aproximadamente 60%, o de aproximadamente 35% a aproximadamente 65%, o de aproximadamente 40% a aproximadamente 70%, o de aproximadamente 45% a aproximadamente 75%, o de aproximadamente 50% a aproximadamente 80%, o de aproximadamente 25% a aproximadamente 55%, o de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1%, o de aproximadamente 1% a aproximadamente 2,5%, o de aproximadamente 2,5% a aproximadamente 5%, o de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5%, o de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%, o de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 10%,

A. Polipéptidos y polinucleótidos

Otros aspectos se refieren a un polipéptido aislado o purificado que comprende, o que consiste esencialmente, o que consiste además en, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia, o alternativamente al menos 85%, o alternativamente al menos 90%, o alternativamente al menos 95%, o alternativamente al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. También se proporcionan polinucleótidos aislados y purificados que codifican el polipéptido correspondiente a la SEQ ID NO: 1, al menos aproximadamente el 80% de la secuencia se identifica con la SEQ ID NO: 1, o alternativamente al menos el 85%, o alternativamente al menos el 90%, o alternativamente al menos 95%, o alternativamente al menos 98% de identidad de secuencia con La SEQ ID NO: 1 o un equivalente, o un polinucleótido que hibrida en condiciones estrictas con el polinucleótido, su equivalente o su complemento y polipéptidos aislados o purificados codificados por estos polinucleótidos.

Otros aspectos se refieren a un polipéptido aislado o purificado que comprende, o que consiste esencialmente en, o aún más que consiste en, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7 u 8 o un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 4-8, o alternativamente al menos 85%, o alternativamente al menos 90%, o alternativamente al menos 95%, o alternativamente al menos 98% de identidad de secuencia a las SEQ ID NO: 4-8. También se proporcionan polinucleótidos aislados y purificados que codifican el polipéptido correspondiente a las SEQ ID NO: 4-8, o un equivalente, o un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con el polinucleótido, su equivalente o su complemento y polipéptidos aislados o purificados codificados por estos polinucleótidos o uno que tenga al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con polinucleótidos que codifican las SEQ ID NO: 4-8, o alternativamente al menos 85%, o alternativamente al menos 90%, o alternativamente al menos 95%, o alternativamente al menos 98% de identidad de secuencia a polinucleótidos que codifican las SEQ ID NO: 4-8.

Listados de secuencias

SEQ ID NO: 1: epítopo de BacIYL: IYLKTNVYL

SEQ ID NO: 2: proteína integrasa (*Bacteroides vulgatus*)

MLEKIRYRLVFNRQKKLNKQGTALVQVEAYLNQRKIYLKTNVYLKPECWSREGAQVINHPQSNELNAMLY
EYILYLQGIELGYWKRGIPATLSLLKDAVKKKSAVNVSFSTFAKSAIDNSDKKQSTKDNLHSTLAVLNDF
RSGLDFKDLTYTFLRDFEQYLREKGNAVNTIAKHMRQLRTLVNEAINQGYMHADAYPFRKYKIKQEKGRH
EFLTPDELKKLETVEVEEKSMRHVLDAFLFCCYTGLRYSDFCQLTPENFIRVNGKRWLYFKSVKTGVEIR
LPLHLLFESRALGILDRYPDIGSLVSLPCNSEVNKQLRKLTGLCGIKKRITYHVSRHTCATLLVHQGVAI
TTVQKLLGHTSVKTTQIYSEVLSSTIVRDLKNVQRKRKKVKMFPDKGLRTSDFIDNR

SEQ ID NO: 3: secuencia de ADN de integrasa (*Bacteroides vulgatus*)

ATGCTAGAGAAGATACGATACAGGTTGGTCTTTAACCGCCAAAAGAAACTGAATAAGCAAGGCACGGCCCTTGTACA
GGTTGAAGCCTATTTGAACCAAAGGAAAATCTACCTGAAGACCAATGTTTACCTCAAACCGGAGTGCTGGAGCCGTG
AGGGGGCACAAGTCATTAACCACCCCCAATCTAACGAACTCAACGCAATGCTCTATGAATACATCCTGTATCTGCAA
GGCATAGAGTTGGGGTATTGGAAGCGCGGAATACCTGCCACACTCTCACTACTGAAGGATGCTGTCAAGAAGAAAAG
TGCCGTGAATGTCAGCTTCTCCACTTTCGCCAAATCAGCCATTGACAATTCGGACAAGAAGCAGTCCACCAAGGACA
ACCTGCACTCGACACTGGCGGTCCTGAATGACTTCCGTTCCGGATTGGACTTCAAGGATCTTACCTATACATTCCTT
CGTGATTTTGAGCAATATTTAAGGGAAAAGGGCAATGCGGTCAATACGATAGCCAAGCACATGAGACAGCTCCGTAC
CTTGGTCAATGAGGCAATCAACCAGGGATATATGCACGCGGACGCTTATCCGTTCAGAAAGTACAAAATCAAACAGG
AGAAAGGCAGACATGAGTTTCTTACCCCGGACGAGCTGAAGAAGCTGGAAACGGTCGAAGTGGAAGAGAAGTCCATG
CGCCATGTGCTCGATGCCTTCCTGTTCTGCTGTTATACCGGATTGCGCTATTCTGACTTCTGCCAGCTCACACCTGA
GAATTTCATTAGAGTAAACGGCAAACGGTGGCTGTACTTCAAATCCGTCAAGACAGGGGTGGAAATCCGTCTGCCGT
TACATCTGCTGTTTGAAAGCAGGGCATTGGGCATTCTTGACCGTTATCCGGATATAGGTAGTCTTGTATCCCTACCC
TGTAACTCGGAAGTGAATAAGCAGCTTCGAAAGCTGACCGGATTGTGTGGTATCAAAAAACGGATAACCTACCATGT
GAGCCGTCATACCTGTGCCACCCTGCTGGTTCATCAGGGAGTTGCGATTACAACAGTCCAGAAGCTGCTCGGACATA
CTTCCGTAAAGACCACACAGATTTATTCGGAGGTACTTTCCAGCACCATTGTGCGTGACTTGAAAAATGTTCAAAGG
AAAAGGAAAAAAGTAAAGATGTTTCCTGATAAAGGCTTGAGAACATCTGATTTTATAGACAACCGGTAG

SEQ ID NO: 4: secuencia peptídica $BacInt_{40-54}$: TNVYLKPECWSREGA

SEQ ID NO: 5: secuencia peptídica $BacInt_{81-95}$: LGYWKRGIPATLSLL

SEQ ID NO: 6: secuencia peptídica $BacInt_{365-379}$: TQIYSEVLSSTIVRD

SEQ ID NO: 7: secuencia peptídica $BacInt_{57-71}$: INHPQSNELNAMLYE

SEQ ID NO: 8: secuencia peptídica $BacInt_{88-102}$: IPATLSLLKDAVKKK

Los antígenos, que incluyen segmentos, fragmentos y otras moléculas derivadas de una especie antigénica, que incluyen pero no se limitan a péptidos, carbohidratos, lípidos u otras moléculas presentadas por moléculas de MHC clásicas y no clásicas de la invención, están usualmente complejas o acopladas operativamente a una molécula de MHC o derivado de la misma. El reconocimiento de antígeno por los linfocitos T está restringido por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Un linfocito T dado reconocerá un antígeno solo cuando está unido a una molécula de MHC particular. En general, los linfocitos T se estimulan solo en presencia de moléculas propias de MHC, y el antígeno se reconoce como fragmentos del antígeno unido a moléculas propias de MHC. La restricción de MHC define la especificidad de linfocitos T en términos del antígeno reconocido y en términos de la molécula de MHC que une su(s) fragmento(s) antigénico(s). En aspectos particulares, ciertos antígenos se combinarán con ciertas moléculas de MHC o polipéptidos derivados de los mismos.

El término "operativamente acoplado" o "recubierto" como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a una situación en la que los componentes individuales de polipéptido (por ejemplo, MHC) y antigénicos (por ejemplo, péptido) se combinan para formar el complejo activo antes de unirse al sitio diana, por ejemplo, una célula inmune. Esto incluye la situación en la que los componentes del complejo de polipéptidos individuales se sintetizan o se expresan de forma recombinante y posteriormente se aíslan y combinan para formar un complejo, *in vitro*, antes de la administración a un sujeto; la situación en la que un polipéptido quimérico o de fusión (es decir, cada componente de proteína discreta del complejo está contenido en una sola cadena de polipéptidos) se sintetiza o se expresa de forma recombinante como un complejo intacto. Usualmente, los complejos de polipéptidos se agregan a las nanopartículas para producir nanopartículas con complejos de polipéptidos adsorbidos o acoplados que tienen una relación de número de moléculas: número de relaciones de nanopartículas de aproximadamente, al menos aproximadamente o como máximo aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 o más a:1, más usualmente 0,1:1, 1:1 a 50:1 o 300:1. En una realización específica, la relación del número de moléculas de antígeno-MHC al número de nanopartículas es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1000:1. El contenido de polipéptidos de las nanopartículas se puede determinar utilizando técnicas estándar.

Los péptidos y proteínas descritos en la presente memoria descriptiva también se pueden usar en procedimientos convencionales para el tratamiento de la inflamación del tracto gastrointestinal. Por consiguiente, ciertos aspectos se relacionan con procedimientos para inducir una respuesta antiinflamatoria en una célula o tejido, que comprende poner en contacto la célula o tejido con una cantidad eficaz de un antígeno, en el que el antígeno es un antígeno derivado de un microbio que reside dentro o infecta a un célula o tejido del tracto gastrointestinal (GI) o es un antígeno asociado al tracto GI. Otro aspecto se refiere a un procedimiento para el tratamiento de la inflamación en un paciente que lo necesite, que comprende administrar una cantidad eficaz de

un antígeno al paciente, en el que el antígeno se deriva de un microbio que reside o infecta una célula o tejido del tracto gastrointestinal o es un antígeno asociado al tracto GI. Un aspecto adicional se refiere a un procedimiento para acumular células T antiinflamatorias en el tracto GI de un paciente que lo necesite, que comprende administrar una cantidad eficaz de un antígeno al paciente, en el que el antígeno es un antígeno derivado de un microbio que reside dentro o infecta una célula o tejido del tracto gastrointestinal o es un antígeno asociado al tracto GI. El antígeno puede ser, por ejemplo, un antígeno que corresponde a un péptido que tiene al menos un 80% de identidad con la secuencia peptídica del grupo: SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 7 u 8. En ciertas realizaciones, el antígeno se compleja con moléculas de MHC antes de la administración. En otras realizaciones, el antígeno se administra con un adyuvante. Los ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, sales minerales y polinucleótidos Completos e Incompletos de Freund. Otros ejemplos no limitantes de adyuvantes adecuados incluyen monofosforil lípido A (MPL), derivados mutantes de la enterotoxina lábil al calor de *E. coli*, derivados mutantes de la toxina del cólera, oligonucleótidos de CPG y adyuvantes derivados del escualeno.

B. Moléculas MHC

Los antígenos intracelulares y extracelulares presentan desafíos muy diferentes para el sistema inmunitario, tanto en términos de reconocimiento como de respuesta apropiada. La presentación de antígenos a las células T está mediada por dos clases distintas de moléculas MHC clase I (MHC-I) y MHC clase II (MHC-II), que utilizan distintas vías de procesamiento de antígeno. Los péptidos derivados de antígenos intracelulares se presentan a las células T CD8+ por medio de las moléculas MHC de clase I, que se expresan en prácticamente todas las células, mientras que los péptidos derivados de antígeno extracelular se presentan a las células T CD4+ por las moléculas MHC-II. Sin embargo, hay ciertas excepciones para esta dicotomía. Varios estudios han demostrado que los péptidos generados a partir de partículas solubles o proteínas endocitosadas se presentan en las moléculas de MHC-I en los macrófagos y en las células dendríticas. En ciertas realizaciones de la invención, se identifica un antígeno particular y se presenta en el complejo antígeno-MHC-nanopartícula en el contexto de un polipéptido MHC de clase I o II apropiado. En ciertos aspectos, la composición genética de un sujeto puede evaluarse para determinar qué polipéptido MHC se utilizará para un paciente particular y un conjunto particular de péptidos.

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

C. Componentes antigénicos

Ciertos aspectos de la invención incluyen procedimientos y composiciones relativas a composiciones antigénicas que incluyen segmentos, fragmentos o epítopos de polipéptidos, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y otras moléculas que provocan o inducen una respuesta antigénica, generalmente denominados antígenos. En particular, los segmentos antigénicos o fragmentos de determinantes antigénicos, que conducen a la destrucción de una célula a través de una respuesta autoinmune, pueden identificarse y usarse para hacer un complejo antígeno-MHC-nanopartícula descrito en la presente memoria descriptiva. Las realizaciones de la invención incluyen composiciones y procedimientos para la modulación de una respuesta inmune en una célula o tejido del cuerpo.

Los polipéptidos y péptidos de la invención pueden modificarse mediante diversas deleciones, inserciones y/o sustituciones de aminoácidos. En realizaciones particulares, los polipéptidos y/o péptidos modificados son capaces de modular una respuesta inmune en un sujeto. En algunas realizaciones, se emplea una versión de tipo salvaje de una proteína o péptido, sin embargo, en muchas realizaciones de la invención, se emplea una proteína o polipéptido modificado para generar un complejo antígeno-MHC-nanopartícula. Se puede usar un complejo antígeno-MHC-nanopartícula para generar una respuesta inmune antiinflamatoria, para modificar la población de células T del sistema inmunitario (es decir, reeducar el sistema inmunitario) y/o fomentar el reclutamiento y la acumulación de células T antiinflamatorias a un tejido particular, como, por ejemplo, un tejido del tracto gastrointestinal. Los términos descritos anteriormente pueden usarse indistintamente en la presente memoria descriptiva. Una "proteína modificada" o "polipéptido modificado" o "péptido modificado" se refiere a una proteína o polipéptido cuya estructura química, particularmente su secuencia de aminoácidos, se altera con respecto a la proteína o polipéptido de tipo salvaje. En algunas realizaciones, una proteína o polipéptido o péptido modificado tiene al menos una actividad o función modificada (reconociendo que las proteínas o polipéptidos o péptidos pueden tener múltiples actividades o funciones). Se contempla específicamente que una proteína o polipéptido o péptido modificado puede alterarse con respecto a una actividad o función, pero conserva una actividad o función de tipo salvaje en otros aspectos, como la inmunogenicidad o la capacidad de

interactuar con otras células del sistema inmunitario cuando se encuentran en el contexto de un complejo MHC-nanopartícula.

Los antígenos de la divulgación incluyen antígenos derivados de proteínas de un microbio común al tracto gastrointestinal. Los microbios comunes al tracto gastrointestinal incluyen, por ejemplo, *Achromobacter spp, Acidaminococcusfermentans, Acinetobacter cacoaceticus, Actinomyces spp, Actinomyces viscosus, Actinomyces naeslundii, Aeromonas spp, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Alistipes putredinis, Anaerotruncus colihominis, Anaerobiospirillum spp, Alcaligenes faecalis, Arachnia propionica, Bacillus spp, Bacteroides spp, Bacteroides caccae, Bacteriodes capillosus, Bacteroides dorei, Bacteroides eggerthii, Bacteroides gingivalis, Bacteroides finegoldii, Bacteroides fragilis, Bacteroides intermedius, Bacteroides intestinalis, Bacteroides melaninogenicus, Bacteroides ovatus, Bacteroides pectinophilus, Bacteroides pneumosintes, Bacteroides stercoris, Bacteroides thetaiotaomicron, Bacteroides uniformis, Bacteroides vulgatus, Bacteroides xylanisolvens, Bacterionema matruchotii, Blautia hansenii, Corynebacterium matruchotii, Bifidobacterium spp, Buchnera aphidicola, Butyrivibrio crossotus, Butyriviberio fibrosolvens, Campylobacter spp, Campylobacter coli, Campylobacter sputorum, Campylobacter upsaliensis, Candida albicans, Capnocytophaga spp, Clostridium spp, Citrobacter freundii, Clostridium asparagiforme, Clostridium difficile, Clostridium leptum, Clostridium nexile, Clostridium scindens, Clostridium sordellii, Collinsella aerofaciens, Coprococcus comes, Coprococcus eutactus, Corynebacterium spp, Dorea formicigenerans, Dorea longicatena, Eikenella corrodens, Enterobacter cloacae, Enterococcus spp, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Escherichia coli, Eubacterium spp, Eubacterium hallii, Eubacterium rectale, Eubacterium siraeum, Eubacterium ventriosum, Faecalibacterium prausnitzii, Flavobacterium spp, Fusobacterium spp, Fusobacterium nucleatum, Gordonia Bacterium spp, Haemophilius parainfluenzae, Haemophilus paraphrophilus, Holdemania filiformis, Lactobacillus spp, Leptotrichia buccalis, Morganella morganii, Mycobacteria spp, Mycoplasma spp, Micrococcus spp, Mycoplasma spp, Mycobacterium chelonae, Neisseria spp, Neisseria sicca, Parabacteroides distasonis, Parabacteroides johnsonii, Parabacteroides merdae, Peptococcus spp, Peptostreptococcus spp, Plesiomonas shigelloides, Porphyromonas gingivalis, Propionibacterium spp, Propionibacterium acnes, Providencia spp, Pseudomonas aeruginosa, Roseburia intestinalis, Ruminococcus bromii, Ruminococcus gnavus, Ruminococcus torques, Ruminococcus lactaris, Ruminococcus obeum, Rothia dentocariosa, Ruminococcus spp, Sarcina spp, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus anginosus, Streptococcus mutans, Streptococcus oralis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus sobrinus, Streptococcus thermophilus, Streptococcus viridans, Subdoligranulum variabile, Torulopsis glabrata, Treponema denticola, Treponema refringens, Veillonella spp, Vibrio spp, Vibrio sputorum, Wolinella succinogenes* y *Yersinia enterocolitica*. Qin et al., (2010) Nature, vol. 464:4 describe bacterias prevalentes en el tracto gastrointestinal. En ciertas realizaciones, el antígeno se deriva de una bacteria que pertenece a los géneros del grupo: *Bacteroides, Clostridium, Dorea, Fusobacterium, Eubacterium, Ruminococcus, Peptococcus, Peptostreptococcus* y *Bifidobacterium*. En una realización relacionada, el antígeno se deriva de *Bacteroides*. En una realización adicional, el antígeno se deriva de una proteína de *Bacteroides*. En otra realización adicional, el antígeno se deriva de la proteína Integrasa. En una realización adicional, el antígeno corresponde a un péptido que tiene al menos un 80% de identidad, o al menos aproximadamente un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, o alternativamente al menos un 85%, o alternativamente al menos un 90%, o alternativamente a al menos el 95%, o alternativamente al menos el 98% de identidad de secuencia con la secuencia peptídica de la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, el antígeno corresponde a un péptido que tiene al menos el 80% de identidad con la secuencia peptídica de las SEQ ID NO: 4-8. Otros antígenos útiles incluyen aquellos que inducen células T que pueden reaccionar de forma cruzada con un antígeno de un microbio intestinal. Por ejemplo, el epítopo $IGRP_{206-214}$ (expresado por las células beta pancreáticas) y NRP-V7 o NRP-A7 (simuladores de $IGRP_{206-214}$) pueden usarse para inducir células T CD8+ de tipo 8.3 que pueden reaccionar de forma cruzada con la secuencia BaclYL.

Los antígenos de la divulgación también incluyen antígenos asociados al tracto GI tales como antígenos conocidos relacionados con la enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, ovoalbúmina), antígenos de dieta como manano de levadura, gliadina y antígenos conocidos relacionados con la enfermedad celíaca tales como la gliadina del gluten.

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

alterarse fusionando o conjugando una secuencia de proteína heteróloga con una función particular (por ejemplo, para presentación como un complejo proteico, para mayor inmunogenicidad, etc.).

Las composiciones proteináceas pueden prepararse mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica, que incluye (i) la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos a través de técnicas estándar de biología molecular, (ii) el aislamiento de compuestos proteináceos a partir de fuentes naturales o (iii) la síntesis química de materiales proteináceos. El nucleótido, así como las secuencias de proteínas, polipéptidos y péptidos para diversos genes se han descrito previamente y se pueden encontrar en las bases de datos computarizadas reconocidas. Una de esas bases de datos son las bases de datos GenBank y GenPept del Centro Nacional de Información Biotecnológica (en la dirección de internet: ncbi.nlm.nih.gov/). La totalidad o parte de las regiones codificantes para estos genes pueden amplificarse y/o expresarse usando las técnicas descritas en la presente memoria descriptiva o como serían conocidas por los expertos en la técnica.

Las variantes de secuencia de aminoácidos de epítopos autoantigénicos y otros polipéptidos de estas composiciones pueden ser variantes de sustitución, inserción o deleción. Una modificación en un polipéptido de la invención puede afectar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 o más aminoácidos no contiguos o contiguos de un péptido o polipéptido, en comparación con el tipo salvaje.

Las variantes de deleción usualmente carecen de uno o más residuos de la secuencia de aminoácidos nativa o de tipo salvaje. Los residuos individuales o varios aminoácidos contiguos se pueden delecionar. Se puede introducir un codón de parada (mediante sustitución o inserción) en una secuencia de ácido nucleico codificante para generar una proteína truncada. Los mutantes de inserción usualmente implican la adición de material en un punto no terminal en el polipéptido. Esto puede incluir la inserción de uno o más residuos. También se pueden generar adiciones terminales, llamadas proteínas de fusión.

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

Las proteínas de la invención pueden ser recombinantes o sintetizadas *in vitro*. Alternativamente, una proteína recombinante puede aislarse de bacterias u otra célula huésped.

También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico pueden incluir residuos adicionales, tales como aminoácidos N o C terminales adicionales, o secuencias de ácido nucleico 5' o 3',

respectivamente, y aún ser esencialmente como establecido en una de las secuencias descritas en la presente memoria descriptiva, siempre que la secuencia cumpla con los criterios establecidos anteriormente, incluido el mantenimiento de la actividad proteica biológica (por ejemplo, inmunogenicidad). La adición de secuencias terminales se aplica particularmente a secuencias de ácido nucleico que pueden, por ejemplo, incluir varias secuencias no codificantes que flanquean cualquiera de las porciones 5' o 3' de la región codificante.

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

La presente invención contempla la administración de un complejo antígeno-MHC-nanopartícula para efectuar un tratamiento contra una enfermedad o afección asociada con la inflamación del tracto gastrointestinal.

Además, la Patente de U.S. N.º 4,554,101 (Hopp) enseña la identificación y preparación de epítopos a partir de secuencias de aminoácidos primarias en funcióm de la hidrofilia. A través de los procedimientos descritos en Hopp, un experto en la técnica podría identificar epítopos potenciales dentro de una secuencia de aminoácidos y confirmar su inmunogenicidad. También se han dedicado numerosas publicaciones científicas a la predicción de la estructura secundaria y a la identificación de epítopos, a partir de análisis de secuencias de aminoácidos (Chou y Fasman, Adv. Enzymol., 47:45-148, 1978; Chous y Fasman, Annu, Rev. Biochem., 47:251-276, 1978, Chou y Fasman, Biochemistry, 13 (2):211-222, 1974; Chau y Fasman, Biochemistry, 13(2):222-245, 1974, Chou y Fasman, Biophys. J., 26 (3):385-399, 1979). Cualquiera de estos puede usarse, si se desea, para complementar las enseñanzas de Hopp en la Patente de U.S. N.º 4,554,101.

Las moléculas distintas de los péptidos pueden usarse como antígenos o fragmentos antigénicos en complejo con moléculas de MHC, tales moléculas incluyen, pero no se limitan a carbohidratos, lípidos, moléculas pequeñas y similares. Los carbohidratos son componentes principales de la superficie externa de una variedad de células. Ciertos carbohidratos son característicos de diferentes etapas de diferenciación y muy a menudo estos carbohidratos son reconocidos por anticuerpos específicos. La expresión de carbohidratos distintos se puede restringir a tipos celulares específicos.

D. Sustratos/Nanopartículas

En cierto aspecto, los complejos antígeno/MHC están acoplados operativamente a un sustrato. Un sustrato puede estar en forma de una nanopartícula que opcionalmente comprende un material biocompatible, bioabsorbible. Por consiguiente, en una realización, la nanopartícula es biocompatible y/o bioabsorbible. Un sustrato también puede tener la forma de una nanopartícula como las descritas anteriormente en la Patente de U.S. N.º 2009/0155292. Las nanopartículas pueden tener una estructura de dimensión variable y se conocen de manera diversa como una nanoesfera, una nanopartícula o una nanoesfera biodegradable biocompatible o una nanopartícula biodegradable biocompatible. Dichas formulaciones en partículas que contienen un complejo antígeno/MHC pueden formarse mediante acoplamiento covalente o no covalente del complejo a la nanopartícula.

Las nanopartículas consisten usualmente en un núcleo sustancialmente esférico y opcionalmente una o más capas. El núcleo puede variar en tamaño y composición. Además del núcleo, la nanopartícula puede tener una o más capas para proporcionar funcionalidades apropiadas para las aplicaciones de interés. El espesor de las capas, si está presente, puede variar según las necesidades de las aplicaciones específicas. Por ejemplo, las capas pueden impartir propiedades ópticas útiles.

Las capas también pueden impartir funcionalidades químicas o biológicas, denominadas en la presente memoria descriptiva capas químicamente activas o biológicamente activas, y para estas funcionalidades la capa o capas pueden variar usualmente en grosor de aproximadamente 0,001 micrómetros (1 nanómetro) a aproximadamente 10 micrómetros o más (dependiendo del diámetro deseado de la nanopartícula), estas capas se aplican usualmente en la superficie externa de la nanopartícula.

Las composiciones del núcleo y las capas pueden variar. Los materiales adecuados para las partículas o el núcleo incluyen, pero no se limitan a polímeros, cerámicas, vidrios, minerales y similares. Los ejemplos incluyen, entre otros, vidrios estándar y especiales, sílice, poliestireno, poliéster, policarbonato, polímeros acrílicos, poliacrilamida, poliacrilonitrilo, poliamida, fluoropolímeros, silicona, celulosas, silicio, metales (por ejemplo, hierro,

oro, plata), minerales (por ejemplo, rubí), nanopartículas (por ejemplo, nanopartículas de oro, partículas coloidales, óxidos metálicos, sulfuros metálicos, seleniuros metálicos y materiales magnéticos como el óxido de hierro) y sus compuestos. El núcleo podría ser de composición homogénea, o un compuesto de dos o más clases de material dependiendo de las propiedades deseadas. En ciertos aspectos, se utilizarán nanopartículas metálicas. Estas partículas metálicas o nanopartículas pueden formarse a partir de Au, Pt, Pd, Cu, Ag, Co, Fe, Ni, Mn, Sm, Nd, Pr, Gd, Ti, Zr, Si e In, precursores, sus aleaciones binarias, sus aleaciones ternarias y sus compuestos intermetálicos. Consulte la Patente de U.S. N.º 6,712,997. En ciertas realizaciones, las composiciones del núcleo y las capas pueden variar siempre que las nanopartículas sean biocompatibles y bioabsorbibles. El núcleo podría ser de composición homogénea, o un compuesto de dos o más clases de material dependiendo de las propiedades deseadas. En ciertos aspectos, se utilizarán nanoesferas metálicas. Estas nanopartículas metálicas pueden formarse a partir de Fe, Ca, Ga y similares.

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

Se pueden producir capas en las nanopartículas en una variedad de formas conocidas por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen técnicas de química de sol-gel como las descritas en Iler, Chemistry of Silica (La química de la sílice), John Wiley & Sons, 1979; Brinker y Scherer, Sol-gel Science (Ciencia sol-gel), Academic Press, (1990). Los enfoques adicionales para producir capas en nanopartículas incluyen la química de la superficie y las técnicas de encapsulación, como se describe en Partch y Brown, J. Adhesion, 67:259-276, 1998; Pekarek et al., Nature, 367: 258, (1994); Hanprasopwattana, Langmuir, 12:3173-3179, (1996); Davies, Advanced Materials (Materiales avanzados), 10:1264-1270, (1998). También se pueden usar técnicas de deposición de vapor; ver por ejemplo Golman y Shinohara, Trends Chem. Engin., 6:1-6, (2000); y la Patente de U.S. N.º 6,387,498. Aún otros enfoques incluyen técnicas de autoensamblaje capa por capa, como se describe en Sukhorukov et al., Polymers Adv. Tech., 9(10-11):759-767, (1998); Caruso et al., Macromolecules, 32(7):2317-2328, (1998); Caruso et al., J.Amer. Chem Soc., 121(25):6039-6046, (1999); y la Patente de U.S. N.º 6,103,379.

Las nanopartículas se pueden formar poniendo en contacto una fase acuosa que contiene el complejo antígeno/MHC/molécula coestimuladora y un polímero y una fase no acuosa seguida de evaporación de la fase no acuosa para provocar la coalescencia de partículas de la fase acuosa como se enseña en Patente de U.S. N.º 4,589,330 o 4,818,542. Los polímeros preferentes para tales preparaciones son copolímeros naturales o sintéticos o polímeros seleccionados del grupo que consiste en agar de gelatina, almidón, arabinogalactano, albúmina, colágeno, ácido poliglicólico, ácido polilláctico, glicolido-L(-) lactido poli(épsilon)caprolactona, poli(ácido épsilon-caprolactona-CO-láctico), poli(ácido épsilon-caprolactona-CO-glicólico), poli(ácido β-hidroxi butirico), poli(óxido de etileno), polietileno, poli(alquilo-2-cianoacrilato), poli(metacrilato de hidroxietilo), poliamidas, poli(aminoácidos), poli(2-hidroxietilo DL-aspartamida), poli(éster urea), poli(L-fenilalanina/etilenglicol/1,6-diisocianatohexano) y poli(metacrilato de metilo). Los polímeros particularmente preferentes son los poliésteres, tales como el ácido poliglicólico, el ácido polilláctico, glicólido-L(-) lactida poli(épisilon)caprolactona, poli(ácido épsilon-caprolactona-CO- láctico) y poli(ácido épsilon-caprolactona-CO-glicólico). Los solventes útiles para disolver el polímero incluyen: agua, hexafluoroisopropanol, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, hexano, benceno o sesquihidrato de hexafluoroacetona.

El tamaño de la nanopartícula puede variar de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1 µm. En ciertas realizaciones, la nanopartícula es inferior a aproximadamente 1 µm. En otras realizaciones, la nanopartícula tiene menos de aproximadamente 500 nm, menos de aproximadamente 400 nm, menos de aproximadamente 300 nm, menos de aproximadamente 200 nm, menos de aproximadamente 100 nm o menos de aproximadamente 50 nm. En realizaciones adicionales, la nanopartícula es de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 15 nm o a aproximadamente 30 nm, 50 nm, 75 nm o 100 nm. En realizaciones adicionales, la nanopartícula es de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 50 nm. En una realización relacionada, la nanopartícula tiene un diámetro de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 nm.

E. Acoplamiento del complejo antígeno-MHC con la nanopartícula

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

La unión puede generarse modificando químicamente el sustrato o la nanopartícula que usualmente implica la generación de "grupos funcionales" en la superficie, siendo dichos grupos funcionales capaces de unirse a un complejo antígeno-MHC, y/o unir la superficie opcionalmente modificada químicamente del sustrato o nanopartícula con las llamadas "moléculas de enlace" unidas de forma covalente o no covalente, seguido de la

reacción del complejo antígeno-MHC con las nanopartículas obtenidas.

El término "molécula de enlace" significa una sustancia capaz de unirse con el sustrato o nanopartícula y también capaz de unirse a un complejo antígeno-MHC.

El término "grupos funcionales", como se usa anteriormente en la presente memoria descriptiva, no está restringido a grupos químicos reactivos que forman enlaces covalentes, sino que también incluye grupos químicos que conducen a una interacción iónica o enlaces de hidrógeno con el complejo antígeno-MHC. Además, debe tenerse en cuenta que no es posible una distinción estricta entre los "grupos funcionales" generados en la superficie y las moléculas de enlace que llevan "grupos funcionales", ya que a veces la modificación de la superficie requiere la reacción de moléculas de enlace más pequeñas, como el etilenglicol, con la superficie de la nanoesfera.

Los grupos funcionales o las moléculas de enlace que los llevan pueden seleccionarse de grupos amino, grupos de ácido carbónico, tioles, tioéteres, disulfuros, guanidino, grupos hidroxilo, grupos amina, dioles vecinales, aldehídos, grupos alfa-haloacetilo, orgánulos de mercurio, grupos éster, haluro de ácido, tioéster de ácido, anhídrido de ácido, isocianatos, isotiocianatos, haluros de ácido sulfónico, imidoésteres, diazoacetatos, sales de diazonio, 1,2-dicetonas, ácidos fosfónicos, ésteres de ácido fosfórico, ácidos sulfónicos, azólidos, imidazoles, indoles, N -maleimidas, compuestos de carbonilo alfa-beta-insaturados, arilhalogenuros o sus derivados.

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

Un ejemplo específico de un ligador covalente incluye poli(etilen)glicol (PEG). El ligador de PEG puede ser un ligador de tiol-PEG-NH_2.

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

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

La superficie del sustrato o nanopartícula puede modificarse químicamente, por ejemplo, mediante la unión de derivados de ácido fosfónico que tienen grupos reactivos funcionales. Un ejemplo de estos derivados de ácido fosfónico o éster de ácido fosfónico es el ácido imino-bis(metilenfosfono) carbónico que puede sintetizarse de acuerdo con la reacción "Mannich-Moedritzer". Esta reacción de unión puede realizarse con sustrato o nanoesfera como se obtiene directamente del procedimiento de preparación o después de un pretratamiento (por ejemplo, con bromuro de trimetilsililo). En el primer caso, el derivado de ácido fosfónico (éster) puede, por ejemplo, desplazar componentes del medio de reacción que todavía están unidos a la superficie. Este desplazamiento se puede mejorar a temperaturas más altas. El bromuro de trimetilsililo, por otro lado, se cree que desalquila los agentes complejantes basados en fósforo que contienen grupos alquilo, creando así nuevos sitios de unión para el derivado de ácido fosfónico (éster). El derivado de ácido fosfónico (éster), o las moléculas de enlace unidas al mismo, pueden mostrar los mismos grupos funcionales que se proporcionan anteriormente. Otro ejemplo del tratamiento de la superficie del sustrato o la nanoesfera implica el calentamiento en un diol como el etilenglicol. Cabe señalar que este tratamiento puede ser redundante si la síntesis ya se realizó en un diol. En estas circunstancias, es probable que el producto de síntesis obtenido directamente muestre los grupos funcionales necesarios. Sin embargo, este tratamiento es aplicable al sustrato o nanopartícula que se produjo en agentes complejantes que contienen N o P. Si dicho sustrato o partícula se somete a un tratamiento posterior con etilenglicol, los ingredientes del medio de reacción (por ejemplo, agente complejante) que aún se unen a la superficie pueden reemplazarse por el diol y/o pueden desalquilarse.

También es posible reemplazar los agentes complejantes que contienen N todavía unidos a la superficie de la partícula por derivados de amina primaria que tienen un segundo grupo funcional. La superficie del sustrato o nanopartícula también se puede recubrir con sílice. La sílice permite una conjugación química relativamente simple de moléculas orgánicas, ya que la sílice reacciona fácilmente con los ligadores orgánicos, como el trietoxisilano o el clorosilano. La superficie de nanopartículas también puede estar recubierta por homo- o

copolímeros. Ejemplos de agentes de acoplamiento polimerizables son: N-(3-aminopropil)-3-mercaptobenzamidina, 3-(trimetoxisilil)propilhidrazida y 3-(trimetoxisilil)propilmaleimida. Otros ejemplos no limitantes de agentes de acoplamiento polimerizables se mencionan en la presente. Estos agentes de acoplamiento se pueden usar solos o en combinación, dependiendo del tipo de copolímero que se genere como recubrimiento.

Otra técnica de modificación de superficie que puede usarse con sustratos o nanopartículas que contienen compuestos de metales de transición oxídicos es la conversión de los compuestos de metales de transición oxídicos mediante cloro gaseoso o agentes de cloración orgánicos en los correspondientes oxicloruros. Estos oxicloruros son capaces de reaccionar con nucleófilos, como los grupos hidroxilo o amino que se encuentran a menudo en las biomoléculas. Esta técnica permite generar una conjugación directa con proteínas, por ejemplo, a través del grupo amino de las cadenas laterales de lisina. La conjugación con proteínas después de la modificación de la superficie con oxicloruros también puede realizarse utilizando un ligador bi-funcional, como la hidrazida de ácido maleimidopropiónico.

Para las técnicas de unión no covalentes, las moléculas de tipo cadena que tienen una polaridad o carga opuesta a la del sustrato o la superficie de la nanoesfera son particularmente adecuadas. Los ejemplos para unir moléculas que pueden estar unidas de forma no covalente a nanoesferas de núcleo/cubierta implican tensioactivos aniónicos, catiónicos o de ion híbrido, proteínas ácidas o básicas, poliaminas, poliamidas, polisulfona o ácido policarboxílico. La interacción hidrófoba entre el sustrato o la nanoesfera y el reactivo anfifílico que tiene un grupo reactivo funcional puede generar el enlace necesario. En particular, son útiles las moléculas de tipo cadena con carácter anfifílico, como los fosfolípidos o los polisacáridos derivados, que pueden reticularse entre sí. La absorción de estas moléculas en la superficie se puede lograr por coincubación. La unión entre la molécula de afinidad y el sustrato o nanopartícula también se puede basar en enlaces no covalentes y autoorganizados. Un ejemplo de esto implica sondas de detección simples con biotina como molécula de enlace y moléculas acopladas a avidina o estrepdavidina.

Los protocolos para reacciones de acoplamiento de grupos funcionales a moléculas biológicas se pueden encontrar en la literatura, por ejemplo en "Bioconjugate Techniques (Técnicas para bioconjugados)" (Greg T. Hermanson, Academic Press 1996). La molécula biológica (por ejemplo, La molécula de MHC o sus derivados) se puede acoplar a la molécula de enlace, de forma covalente o no covalente, en línea con los procedimientos estándar de la química orgánica, tales como oxidación, halogenación, alquilación, acilación, adición, sustitución o amidación. Estos procedimientos para acoplar la molécula de enlace covalente o no covalente se pueden aplicar antes del acoplamiento de la molécula de enlace al sustrato o la nanoesfera o posteriormente. Además, es posible, mediante incubación, efectuar una unión directa de moléculas al sustrato o nanopartícula pretratada correspondientemente (por ejemplo, con bromuro de trimetilsililo), que muestran una superficie modificada debido a este pretratamiento (por ejemplo, una carga mayor o superficie polar).

F. Producción de proteínas

La presente invención describe polipéptidos, péptidos y proteínas para su uso en diversas realizaciones de la presente invención. Por ejemplo, los péptidos específicos y sus complejos se analizan para determinar su capacidad para provocar o modular una respuesta inmune. En realizaciones específicas, todos o parte de los péptidos o proteínas de la invención también se pueden sintetizar en solución o sobre un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Varios sintetizadores automáticos están disponibles comercialmente y pueden usarse de acuerdo con protocolos conocidos. Ver, por ejemplo, Stewart y Young, Solid Phase Peptide Synthesis (Síntesis de péptidos en fase sólida), 2da. Ed., Pierce Chemical Co., (1984); Tam et al., J. Am. Chem Soc., 105:6442, (1983); Merrifield, Science, 232(4748):341-347, (1986); y Barany y Merrifield, The Peptides (Los péptidos), Gross y Meinhofer (Eds.), Academic Press, NY, 1-284, (1979). Alternativamente, se puede emplear tecnología de ADN recombinante en la que una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de la invención se inserta en un vector de expresión, se transforma o transfecta en una célula huésped apropiada y se cultiva en condiciones adecuadas para la expresión.

Una divulgación incluye el uso de transferencia de genes a células, incluidos microorganismos, para la producción de proteínas. El gen para la proteína de interés puede transferirse a células huésped apropiadas seguido de cultivo de células en las condiciones apropiadas. Se puede emplear un ácido nucleico que codifica prácticamente cualquier polipéptido. La generación de vectores de expresión recombinantes, y los elementos incluidos en los mismos, son conocidos por un experto en la técnica y se discuten brevemente en la presente. Los ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, células Vero y HeLa, otras líneas celulares B y T, tales como CEM, 721.221, H9, Jurkat, Raji, así como líneas celulares de ovario de hámster chino, W138, BHK, COS-7, 293, células HepG2, 3T3, RIN y MDCK. Además, se puede elegir una cepa de la célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o que modifica y procesa el producto génico de la manera deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación

postraduccional de las proteínas. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas huéspedes apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada.

Se pueden usar varios sistemas de selección que incluyen, pero no se limitan a, timidina quinasa de HSV, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa y genes de adenina fosforibosiltransferasa, en células tk-, hgprt- o aprt, respectivamente. Además, la resistencia antimetabolito se puede utilizar como base de selección: para dhfr, que confiere resistencia a trimetoprima y metotrexato; gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico; neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G418; e hygro, que confiere resistencia a la higromicina.

G. Ácidos nucleicos

La presente invención puede incluir polinucleótidos recombinantes que codifican las proteínas, polipéptidos, péptidos de la invención, tales como, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1, 2 o 3. Las secuencias de ácido nucleico para antígenos ejemplares y moléculas de MHC para presentar los antígenos están incluidos y pueden usarse para preparar un complejo antígeno-MHC.

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

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

IV. Composiciones farmacéuticas y administración

En la presente memoria descriptiva se proporcionan composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de enfermedades.

A. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones de la invención pueden administrarse convencionalmente por vía parenteral, por inyección, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales. Las formulaciones orales incluyen excipientes empleados normalmente, tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen aproximadamente 10% a aproximadamente 95% de ingrediente activo, preferentemente aproximadamente 25% a aproximadamente 70%. La preparación de una composición acuosa que contiene un complejo antígeno-MHC-nanopartícula que modifica la condición inmune del sujeto será conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. En ciertas realizaciones, se puede inhalar una composición (por ejemplo, la Patente de U.S. N.º 6,651,655). En una realización, el complejo antígeno-MHC-nanopartícula se administra sistémicamente.

Usualmente, las composiciones de la invención se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz y modificador inmune. La cantidad a administrar depende del sujeto a tratar. Las cantidades precisas de ingrediente activo que deben administrarse dependen del criterio del profesional. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados son del orden de diez a varios cientos de nanogramos o microgramos de complejo antígeno-MHC-nanopartícula por administración. Los regímenes adecuados para la administración inicial y los refuerzos también son variables, pero se caracterizan por una administración inicial seguida de administraciones posteriores.

En muchos casos, será deseable tener múltiples administraciones de un complejo péptido-MHC-nanopartícula, aproximadamente, como máximo aproximadamente o al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más.

Las administraciones normalmente oscilarán entre intervalos de 2 días a doce semanas, más habitualmente de intervalos de una a dos semanas. Los refuerzos periódicos a intervalos de 0,5-5 años, generalmente dos años, pueden ser deseables para mantener la condición del sistema inmunitario. El curso de las administraciones puede ser seguido por ensayos de respuestas inmunes inflamatorias y/o actividad de células T antiinflamatorias autorreguladoras.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto. Diferentes aspectos de la presente invención implican administrar una cantidad eficaz de una composición compleja de antígeno-MHC-nanopartícula a un sujeto. Además, tales composiciones pueden administrarse en combinación con modificadores del sistema inmunitario. Dichas composiciones generalmente se disolverán o dispersarán en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

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

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

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

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

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el solvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización. La esterilización de la solución se realizará de tal manera que no disminuya las propiedades terapéuticas del complejo antígeno-MHC-nanopartícula. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferentes de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo, más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada del mismo. Uno de estos procedimientos de esterilización de la solución es la filtración estéril, sin embargo, la presente invención pretende incluir cualquier procedimiento de esterilización que no disminuya significativamente las propiedades terapéuticas de los complejos antígeno-MHC-nanopartícula. Los procedimientos de esterilización que implican calor y presión intensos, como el autoclave, pueden comprometer la estructura terciaria del complejo, disminuyendo significativamente las propiedades terapéuticas de los complejos antígeno-MHC-nanopartícula.

Se determina una cantidad eficaz de composición terapéutica en base al objetivo pretendido. El término "dosis unitaria" o "dosificación" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para su uso en un sujeto, cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de la composición calculada para producir las respuestas deseadas discutidas anteriormente en asociación con su administración, es decir, la vía apropiada y régimen. La cantidad a administrar, tanto según el número de tratamientos como la dosis unitaria, depende del resultado y/o

protección deseada. Las cantidades precisas de la composición también dependen del juicio del profesional y son propias de cada individuo. Los factores que afectan la dosis incluyen el estado físico y clínico del sujeto, la vía de administración, el objetivo previsto del tratamiento (alivio de los síntomas versus la cura) y la potencia, estabilidad y toxicidad de la composición particular. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéutica o profilácticamente efectiva. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente.

B. Terapia de combinación

Las composiciones y procedimientos relacionados de la presente invención, particularmente la administración de un complejo antígeno-MHC-nanopartícula, también se pueden usar en combinación con la administración de terapias tradicionales. Estos incluyen, entre otros, medicamentos antiinflamatorios como la sulfasalazina, corticosteroides como la prednisona y supresores del sistema inmunitario como la azatioprina y la mercaptopurina. Un antibiótico, como el metronidazol, también puede ser útil para matar gérmenes en los intestinos.

Para ayudar a tratar los síntomas, un médico puede recomendar antidiarreicos, laxantes, analgésicos u otros medicamentos de venta libre (OTC). Los esteroides generalmente se usan para personas que tienen una forma más grave de la enfermedad de Crohn. En enfermedades más agresivas, los esteroides pueden usarse con inmunosupresores o con un medicamento más nuevo llamado infliximab.

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

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

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

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

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

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

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término administración *in vitro* se refiere a manipulaciones realizadas en células eliminadas de o fuera de un sujeto, que incluyen, pero no se limitan a células en cultivo. El término administración *ex vivo* se refiere a células que han sido manipuladas *in vitro* y posteriormente se administran a un sujeto. El término administración *in vivo* incluye todas las manipulaciones realizadas dentro de un sujeto, incluidas las administraciones.

En ciertos aspectos de la presente invención, las composiciones pueden administrarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En ciertas realizaciones *in vitro*, las células T autólogas se incuban con composiciones de la presente invención. Las células o el tejido se pueden usar para análisis *in vitro*, o alternativamente para administración *ex vivo*.

V. Ejemplos

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

Ejemplo 1

Integrasa de Bacteroides como diana antigénica de las células T autorreguladoras de tipo memoria

Se investigó si un nuevo epítopo de Integrasa de Bacteroides (BacIYL: SEQ ID NO: 1) podría unirse a la molécula de clase I H-2K^{d} del complejo mayor de histocompatibilidad de ratón NOD, en un intervalo de concentraciones, en comparación con TUM (un control positivo), IGRP$_{206-214}$ y Gp33 codificada por LCMV (un control negativo de unión a Db). Como se muestra en la Figura 1A, la secuencia BacIYL (SEQ ID NO: 1) se unió

a las moléculas de K^d en la superficie de las células RMA-SK^d deficientes en el Procesamiento de Antígenos Asociados con el Transportador (TAP) tan eficientemente como $IGRP_{206-214}$ y TUM.

Para determinar si el complejo péptido BaclYL/K^d péptido-MHC (pMHC) podría ser reconocido por las células T CD8+ reactivas $IGRP_{206-214}$, células T CD8+ esplénicas vírgenes de ratones NOD transgénicos 8.3-TCR (8.3-NOD) se tiñeron con TUM/K^d conjugado con fluorocromo (control negativo), NRP-V7/K^d (control positivo) y tetrámeros BaclYL/K^d pMHC. Como se muestra en la Figura 1B, las células T 8.3-CD8+ se unieron a los tetrámeros Bac-IYL/Kd de manera eficiente, aunque con una intensidad de fluorescencia media más baja (mfi) como tetrámeros $IGRP_{206-214}$/K^d, lo que sugiere que el 8.3-TCR se une a este Complejo pMHC con baja afinidad. Esto se confirmó llevando a cabo análisis de parcela Scatchard de la unión del tetrámero en equilibrio. Como se muestra en la Figura 1C, los tetrámeros Bac-IYL/Kd se unieron a las células T 8.3-CD8+ con una avidez ~2 veces menor.

Para investigar si la secuencia de Bac-IYL tenía actividad agonista en células T vírgenes 8.3-CD8+, las células T vírgenes 8.3-CD8+ se cultivaron con TUM (control negativo), $IGRP_{206-214}$ (control positivo) y Bac-IYL durante 24 horas. A diferencia de $IGRP_{206-214}$, que provocó la regulación positiva tanto de CD44 como de CD69, Bac-IYL solo pudo inducir la regulación positiva de CD69 (Figura 2A). Esto indicó que Bac-IYL tenía actividad agonista parcial, consistente con la baja avidez de unión de los tetrámeros correspondientes observados en la Figura 1C. Debido a que los linfocitos T citotóxicos 8.3 diferenciados (CTL 8.3) no matan los objetivos pulsados por BaclYL o las células HEK293-K^d transfectadas con ADNc que codifican Integrasa, estos datos muestran que BaclYL puede unirse y 'cosquillear' el 8.3-TCR sin conducir la mayoría de los programas de activación de células T aguas abajo del TCR.

Debido a que ciertos ligandos de unión a TCR de baja avidez tienen propiedades antagonistas (además de la actividad agonista parcial a densidades de ligando más altas), se investigó si BaclYL podría antagonizar las respuestas de células T 8.3-CD8+ inducidas por $IGRP_{206-214}$. Como se muestra en la Figura 2B, Bac-IYL pero no TUM (un péptido de unión a K^d que no es reconocido por el 8.3-TCR) pudo antagonizar las respuestas de células T 8.3-CD8+ inducidas por $IGRP_{206-214}$ (IFNγ secreción y proliferación) en un intervalo de concentraciones (por encima de 1 μM). Por lo tanto, cuando se presenta a las células T 8.3-CD8+ de forma aislada, Bac-IYL se une a TCR de tipo 8.3 con poca avidez, antagoniza las respuestas inducidas por el agonista a densidades de ligando relativamente bajas e induce respuestas agonistas parciales a altas densidades de ligando.

Sin estar limitado por la teoría, se creía que Bac-IYL, *in vivo*, codificado en cepas bacterianas intestinales prevalentes, no se presentaría de forma aislada, sino más bien en el contexto de ligandos de receptores de tipo bacteriano, tales como LPS. Esto, a su vez, podría anular las propiedades antagónicas de Bac-IYL y permitirle una actividad agonista. De acuerdo con esta hipótesis, las células T vírgenes 8.3-CD8+ montaron IFNγ eficiente y respuestas proliferativas a Bac-IYL en presencia de LPS (Figura 2C).

Los péptidos antigénicos codificados en bacterias deben procesarse a partir de la proteína de longitud completa del donante por células presentadoras de antígeno (APC, tales como las células dendríticas -DC-) profesionales. En el caso del péptido Bac-IYL, su proteína donante, la Integrasa de Bacteroides, tendría que ser procesada por el proteasoma y los péptidos resultantes transportados al ER para unirse a las moléculas endógenas de MHC (Kd), que luego serían transportadas a la membrana plasmática de la APC para la exposición a las células T. Para investigar si las DC podrían procesar la proteína Integrasa de Bacteroides y generar complejos Bac-IYL/K^d capaces de provocar la activación de las células T 8.3-CD8+, se produjeron y purificaron preparaciones de Integrasa recombinante fusionadas con GST que codifican la secuencia Bac-IYL de tipo salvaje o un epítopo Bac-IYL mutado idéntico a $IGRP_{206-214}$. Posteriormente, las DC se alimentaron con proteínas recombinantes (en presencia de LPS) y células T 8.3-CD8+, para medir la activación de las células T 8.3-CD8+. Como se muestra en la Figura 2D, ambos tipos de preparaciones de Integrasa recombinante indujeron la activación de las células T 8.3-CD8+, particularmente la que codifica $IGRP_{206-214}$, como se esperaba. Por lo tanto, las DC pueden procesar Integrasa de Bacteroides y generar epítopos capaces de activar las células T afines.

Debido a que las células T autorreactivas de baja avidez tienden a diferenciarse en células T autorreguladoras (autoinmunes supresoras de enfermedades) anérgicas (no proliferativas, pero secretoras de citocinas) de tipo memoria, que responden a la estimulación autoantigénica crónica, se consideró que Bac-IYL podría inducir células T 8.3-CD8+ de tipo memoria *in vitro*. Como se muestra en la Figura 3A, las células T 8.3-CD8+ (pero no las células T 17.6-CD8+ reactivas $IGRP_{206-214}$ de baja avidez) cultivadas en presencia del péptido Bac-IYL durante 28 días expresaron la activación tardía de las células T. marcador CD44 y bajos niveles del marcador de células T vírgenes CD62L. Además, estas células expresaron el marcador de activación temprana CD69 y CD122, un marcador de células T de memoria (Figura 3B). Funcionalmente, estas células se comportaron como las células T de memoria. Por lo tanto, produjeron rápidamente IFNg en respuesta a las DC pulsadas por agonista ($IGRP_{206-214}$) (Figuras 3C y D). Sin embargo, a diferencia de las células T CD8+ de tipo memoria convencionales, y como las células T CD8+ autorreguladoras, mostraron una falta de respuesta proliferativa (anergia) en comparación con las células T 8.3-CD8+ vírgenes (Figura 3D). Por consiguiente, estas células T CD8+ activadas por Bac-IYL tienen todas las características de las células T CD8+ autorreguladoras que surgen

espontáneamente, *in vivo*, en respuesta a la estimulación autoantigénica crónica.

Se ha documentado que los ratones TCRa-/- pueden desarrollar IBD espontánea (consulte, por ejemplo, Mombaerts, P., et al. (1993) Cell 75:274-282) o IBD inducida por DSS (consulte, por ejemplo, Mahler, M., et al. (1998) Am J Physiol 274: G544-551) y la cepa NOD también es susceptible a la IBD inducida por DSS (consulte, por ejemplo, Mahler, M., et al. (1998) Am J Physiol 274:G544-55.). Se sabe que varios factores, como la composición genética, ambiental, de la flora microbiana intestinal, la estructura de la capa epitelial intestinal, así como los elementos del sistema inmunitario innato y adaptativo, contribuyen a la iniciación, progresión y regulación de la IBD, aunque a través de mecanismos mal entendidos. La IBD se define como la inflamación debajo de las capas mucosa y epitelial de la pared intestinal (consulte, por ejemplo, Nell, S., et al. Nat Rev Microbiol 8:564-577; Maloy, KJ, et al. Nature 474:298- 306; Khor, B., et al. Nature 474:307-317; y Kaser, A., et al. (2010) Annu Rev Immunol 28:573-621). Para investigar la importancia biológica del reconocimiento de $BaclYL_{36-44}$ por las células T CD8+ afines en el contexto de la IBD, los solicitantes compararon la susceptibilidad de ratones NOD.$IGRP_{206-214}^{-/-}$ transgénicos 8.3- vs. 17.6-TCR (que llevan células T CD8+ específicas de $IGRP_{206-214}$ capaces de reconocer o no reconocer $BaclYL_{36-44}$, respectivamente). Los ratones se expusieron a DSS al 2% en el agua potable durante 1 semana, para comprometer la integridad del epitelio intestinal y exponer la microbiota intestinal al tejido linfoide asociado al intestino (GALT) sin inducir una enfermedad manifiesta (sangrado o pérdida de peso). Después de una semana adicional con 0% de DSS, estos ratones fueron expuestos a tres ciclos de 3,5% de DSS (semana 1)/0% de DSS (semana 2 y 3). Como se muestra en las Figuras 4A, 4B y 4E, los ratones 8.3-NOD mostraron una resistencia significativa a la colitis y ninguna mortalidad en comparación con los ratones 17.6-NOD, lo que sugiere que la activación *in vivo* de las células 8.3-CD8+ por el epítopo Bac-IYL36-44 hizo que los huéspedes fueran resistentes a la colitis. Además, los ratones 8.3-NOD que carecían de integrina β7 eran altamente susceptibles a la colitis (Figuras 4C, 4D y 4F). Estos resultados respaldan la idea de que el efecto anticolitogénico de las células T 8.3-CD8+ requiere el reclutamiento a GALT.

Los datos anteriores predijeron que los ratones NOD.$IGRP_{206-214}^{-/-}$, que exportan un mayor número de células CD8+ reactivas ($BaclYL_{36-44}$ con reactividad cruzada) $IGRP_{206-214}$ de alta avidez a la periferia, deberían mostrar una resistencia relativa a la colitis inducida por DSS frente a ratones NOD de tipo salvaje, en los que se elimina una fracción significativa de estas células T CD8+ de mayor avidez. De hecho, como se muestra en la Figura 4G, los ratones NOD.$IGRP_{206-214}^{-/-}$, a diferencia de los ratones NOD, eran resistentes a la pérdida de peso resultante del 4% de DSS. Para investigar directamente el papel de una respuesta de células T CD8+ citotóxicas contra APC cargadas con $BaclYL_{36-44}$ en resistencia a la colitis, se alimentó DSS al 4% a los huéspedes NOD.$IGRP_{206-214}^{-/-}$ junto con inyecciones IV de 8.3-CTL diferenciado *in vitro* (linfocitos T citotóxicos). Como se muestra en la Figura 4H, los huéspedes transfundidos con 8.3-CTL tenían puntajes de actividad de la enfermedad más bajas que los ratones no transfundidos.

Para corroborar aún más estos resultados, los solicitantes determinaron la capacidad de 8.3-CTL para proteger a los ratones 17.6-NOD, que son altamente susceptibles a la colitis inducida por DSS, de la enfermedad. Como se muestra en la Figura 5A, los ratones con 17.6-NOD transferidos por CTL 8.3 (una transferencia por CTL por semana) no perdieron peso significativamente durante un seguimiento de 35 días, en comparación con los ratones con 17.6-NOD no transferidos por CTL. Además, la transferencia de 8.3-CTL redujo significativamente los puntajes de actividad de la enfermedad en estos animales (Figura 5B). En su conjunto, estos datos respaldan la idea de que una respuesta CTL contra un epítopo bacteriano intestinal proporciona resistencia a la colitis. Por consiguiente, los enfoques capaces de provocar la activación y expansión *in vivo* de CTL específicos de microbiota intestinal deben tener importancia terapéutica en la IBD.

Los datos descritos en la presente memoria descriptiva demuestran de manera concluyente que la Integrasa de Bacteroides es una diana antigénica de *buena fe* de las células T anti-IBD en el tejido linfoide asociado al intestino. Por consiguiente, este antígeno podría usarse como una diana para fomentar el reclutamiento y la acumulación de células T autorreguladoras (antiinflamatorias) en el intestino en la enfermedad inflamatoria intestinal. En una realización, el tratamiento sistémico de sujetos con nanopartículas recubiertas con complejos de péptido-MHC de clase I induce células T CD8+ específicas de antígeno (autoreguladoras de tipo 8.3, tanto convencionales como de memoria). En otra realización, el tratamiento sistémico de sujetos con nanopartículas recubiertas con complejos péptido-MHC de clase II induce células T CD4+ reguladoras de T específicas para antígeno (productoras de IL-10/TGFb). De hecho, las células T CD4+ de tipo Tr1 expandidas por nanopartículas recubiertas con la molécula de MHC de clase II de ratón NOD I-A^{g7} que presentan un epítopo autoantigénico derivado de IGRP se acumulan en el tejido linfoide asociado al intestino, incluyendo parches de Peyer y agregados de linfocitos intraepiteliales. La Figura 6 muestra datos de dos ratones curados de diabetes mediante tratamiento con nanopartículas recubiertas con $IGRP_{4-22}$/I-A^{g7}: estos ratones se analizaron a las 50 semanas de edad; el tetrámero GPI/ I-A^{g7} es un tetrámero de control negativo).

Por consiguiente, las nanopartículas recubiertas con moléculas MHC de clase I y/o II que presentan epítopos de *Integrasa de Bacteroides* provocan la expansión de células T CD4+ CD8+ o de tipo Tr1 específicas de la Integrasa, la mayoría de las cuales se acumularán en el intestino, ayudando a restaurar el sistema inmunitario homeostasis en individuos afectados con IBD. Por lo tanto, las composiciones de la presente divulgación también

proporcionan este procedimiento de tratamiento.

Ejemplo 2

Procedimiento para fabricar complejos antígeno-MHC-nanopartícula

Nanopartículas inorgánicas (óxido de hierro = IONP; oro = GNP) de un tamaño deseado. Los IONP se producen por descomposición térmica. Los IONP sintetizados como tales son biocompatibles y pueden PEGilarse para la conjugación de proteínas. Para recubrir pMHC y/u otras proteínas sobre IONP, las NP recubiertas con tensioactivo se hacen reaccionar con ligadores PEG funcionalizados de la longitud apropiada. Los ligadores se purifican por HPLC y se caracterizan por ^{1}H-NMR, MALDI/GPC y GPC, para confirmar la identidad química, la pureza, el peso molecular y la polidispersidad. Se pueden usar ligadores y enfoques similares para recubrir las GNP, excepto que los ligadores tendrán un grupo tiol (SH) en su extremo de unión a NP.

Ejemplo 3

Tamaño, densidad y exposición de nanopartículas recubiertas con pMHC

I. Síntesis y caracterización de NP recubiertas con pMHC a base de oro

Se sintetizaron nanopartículas de oro (GNP) de tamaños específicos. El tamaño, la densidad, la carga superficial y la monodispersidad de las preparaciones de GNP se miden mediante espectrofotometría, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y dispersión dinámica de luz. Las muestras de GNP se concentran y se conjugan con complejos de pMHC monoespecíficos utilizando diferentes enfoques como se describe a continuación. Los solicitantes han desarrollado procedimientos para cuantificar la valencia de pMHC por GNP y para concentrar las preparaciones de GNP recubiertas con pMHC de diferentes tamaños a altas densidades ($\sim 10^{14}$/ml) sin comprometer la monodispersión (Figura 19).

II. Caracterización de la capacidad de unión a pMHC de las GNP

Los complejos de pMHC se recubrieron sobre GNP de varios tamaños usando dos enfoques diferentes: (i) unión aleatoria de pMHC a la superficie de GNP mediante interacciones electrostáticas; y (ii) unión direccional a través de un ligador tiol-PEG-NH_2 (en este caso, se usó un ligador tiol-PEG adicional como estabilizador de GNP para evitar la agregación). Se creía que el primer enfoque permitiría densidades de ligando muy altas (de pMHC por GNP) al tiempo que comprometería la direccionalidad de la unión de pMHC (es decir, solo una fracción de las moléculas podría estar disponible para su reconocimiento por los linfocitos T afines). El segundo enfoque tenía como objetivo generar GNP recubiertos con pMHC que llevaban densidades más bajas de pMHC pero unidas direccionalmente, a través de sus terminales C. Ambos enfoques se probaron en GNP de varios diámetros, que varían de 14 a 40 nm. Se confirmó que, para ambos enfoques, la capacidad de unión a pMHC de las GNP es una función del tamaño, y más específicamente del área de superficie (mayor número de pMHC en NP más grandes). Sorprendentemente, se descubrió que la unión mediada por PEG no solo garantiza la direccionalidad de la unión, sino que también mejora la capacidad de unión de las GNP individuales (contrario a las expectativas iniciales). La Tabla 1 a continuación resume los datos.

Tabla 1. Capacidad de unión a pMHC de las GNP

Diámetro (nm)	Área de Superficie: (× 10^2 nm^2)	pMHC/GNP (absorción)	pMHC/GNP (ligador)
14	7		212
20	12		3750
30	28	335	
40	50	2850	5250

III. Actividad agonista versus contenido de pMHC

Se ensayaron los efectos de la valencia de pMHC, el tamaño de GNP, la densidad de GNP y la estrategia de recubrimiento sobre la actividad funcional (agonista) de las GNP recubiertos con pMHC *in vitro*. La capacidad de varias preparaciones de $IGRP_{206-214}$-K^d-GNP para activar células T CD8+ vírgenes afines (específicas de $IGRP_{206-214}$) (en lo sucesivo denominadas 'células T 8.3-CD8+') derivadas del receptor de células T (TCR) se compararon ratones NOD transgénicos (o ratones 8.3-NOD). El primer conjunto de experimentos tuvo como objetivo comparar los efectos de la valencia $IGRP_{206-214}$-K^d (pMHC) en un intervalo de densidades de GNP en el cultivo. Las GNP conjugados con un complejo de control (no relacionado) pMHC (Tum-K^d) se usaron como controles negativos. Como se esperaba, las GNP recubiertos con $IGRP_{206-214}$-K^d (pero no recubiertos con TUM-

K^d) activaron estas células T (según lo medido por la producción de IFNγ), y lo hicieron de una manera dependiente de la dosis de GNP (por ende, dosis de pMHC). La Figura 20 muestra un experimento usando GNP de ~14 nm recubiertos con diferentes números de moléculas de pMHC/GNP usando el procedimiento de enlace. La Figura 20 compara las cantidades de IFNγ secretadas por las células T 8.3-CD8+ afines en respuesta a dos muestras diferentes de pMHC-GNP (ambas compuestas de $\sim 2\times10^{13}$ GNP de 14 nm de diámetro/ml). Au-022410 y Au-21910 portaban ~250 y ~120 pMHCs/GNP, respectivamente. Au-011810-C llevaba ~120 control pMHCs/GNP. Las GNP recubiertos con números ~2 veces mayores de complejos pMHC/GNP tuvieron una actividad agonista superior. Por lo tanto, la actividad agonista de las GNP recubiertos con pMHC es una función del contenido total de pMHC (GNP). Estos resultados fueron contra-intuitivos ya que el estado de la técnica sugeriría que, en ausencia de moléculas coestimuladoras en las NP, el aumento del número de pMHC en NP individuales también aumentaría la avidez y debería promover la deleción (muerte celular), en lugar de la proliferación y secreción de citocinas de células T afines. Esto sería cierto tanto para las células T de baja avidez como para las de alta avidez. Por ejemplo, el trabajo previo de los solicitantes (Han et al., Nature Medicine, 2005) y otros indicaron que los péptidos reconocidos con alta avidez o los péptidos reconocidos con baja avidez, pero a altas concentraciones tienen una mayor capacidad para eliminar células T afines *in vivo*. Por lo tanto, en el contexto de la administración terapéutica de nanopartículas recubiertas con antígeno-MHC intravenoso o péptidos solubles, las células T afines deben someterse a deleción por afinidad peptídica y de manera dependiente de la dosis. Esta expectativa no se cumplió con los datos que se muestran en la Figura 20.

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

Para investigar más a fondo el papel de la valencia del péptido-MHC (pMHC) sobre las propiedades agonistas de las nanopartículas conjugadas con pMHC (pMHC-NP), se comparó la capacidad de las NP de óxido de hierro (Fe304) de 8 nm de diámetro acoplados covalentemente con un número creciente de monómeros de pMHC $IGRP_{206-214}/K^d$, para desencadenar la secreción de IFN-gamma (IFNγ) por células T CD8+ específicas ($IGRP_{206-214}/K^d$ específicas) (en la presente memoria descriptiva denominadas células T 8.3-CD8+) *in vitro*. Como se muestra en la Tabla 2, las células T 8.3-CD8+ produjeron cantidades insignificantes de IFNγ cuando se cultivaron en presencia de NP recubiertos con 8 monómeros pMHC por cada NP, pero produjeron cantidades sustancialmente más altas de IFNγ en respuesta a NP recubiertas con valencias de pMHC más altas, incluso cuando tan bajo como 11 pMHC monómeros/NP, de una manera en respuesta a la dosis.

Tabla 2. Secreción de IFNγ por las células T 8.3-CD8+ en respuesta a NP conjugadas con valencia de pMHC creciente (a 5×10^{11} NP/ml)

Nanopartículas (NP)	Propiedad del Núcleo	Tamaño del Núcleo (nm)	Valencia de pMHC	Respuestas de IFNγ (ng/mL)
IGRP-SFPM-110512	Fe_3O_4	8	8	0,03
IGRP-SFP-102912	Fe_3O_4	8	11	0,4
IGRP-SFP-012011	Fe_3O_4	8	14	0,2
IGRP-SFP-031511	Fe_3O_4	8	15	0,15
IGRP-SFP-051211	Fe_3O_4	8	31	0,7
IGRP-SFP-100711	Fe_3O_4	8	39	0,9
IGRP-SFP-011411	Fe_3O_4	8	54	2,3

Este efecto positivo de la valencia de pMHC sobre la actividad agonista de pMHC-NP se mantuvo en un intervalo de densidades de pMHC-NP (Figura 21). Sin embargo, es notable que 25×10^{11} NP (por ml) con 11 pMHC/NP tenían una actividad agonista similar a 5×10^{11} NP (por ml) con 54 pMHC/NP, aumentando el número de NP con 8 pMHC/NP a valores tan altos como 40×10^{11} NP/ml tuvieron efectos mínimos (Figura 22). Tomados en conjunto, estos resultados indican que existe un umbral de valencia de pMHC, que se encuentra entre 9 y 11 pMHC/NP, por debajo del cual los aumentos relativamente pequeños en el número de NP (es decir, 5 veces) no pueden superar la baja actividad agonista de los pMHC-NP recubiertos a bajas valencias (se observa que el uso de > 50×10^{11} NP en estos experimentos *in vitro* no es informativo debido a la toxicidad celular causada por las altas densidades de NP).

Este efecto de umbral de valencia de pMHC se ilustra adicionalmente en la Figura 23, en la que los datos de secreción de IFNγ se normalizan a la concentración de pMHC total suministrado por las NP recubiertas en los cultivos. Las NP que transportan 11 pMHC/NP desencadenaron respuestas de IFNγ significativamente más altas en un intervalo de concentraciones de pMHC que las activadas por las NP que transportan 8 pMHC/NP. Además, las diferencias en las propiedades agonísticas de estas dos preparaciones de NP aumentaron sustancialmente con el contenido total de pMHC. Es decir, las diferencias en las propiedades agonísticas de 2,4 µg/ml de pMHC entregadas por las NP como octámeros versus monodecámeros fueron mucho mayores que las diferencias en

las propiedades agonísticas de las mismas formulaciones a concentraciones 10 veces más bajas de pMHC total.

La Figura 24 muestra que estos efectos profundos de la valencia de pMHC sobre las propiedades agonistas de pMHC-NP también se pueden ver cuando se usan NP más grandes (que pueden aceptar valencias de pMHC mucho más altas que las NP de 8 nm estudiadas en las Figuras 21-23) utilizadas a densidades de NP más bajas (para normalizar el contenido total de óxido de hierro en los cultivos). Mientras que las NP de 18 nm de diámetro que portaban < 10 pMHC/NP prácticamente no tenían actividad biológica hasta 4×10^{11} NP/ml, la actividad agonista de las NP de 18 nm de diámetro que portaban valencias de pMHC más altas aumentó linealmente con la densidad de NP. Comparación de las Figuras 23 y 24 muestran además que 2×10^{11} NP de 18 nm que entregan 61 pMHC/NP tienen una actividad agonista similar a 2×10^{11} NP de 8 nm que entregan un número similar (54) de pMHC/NP, lo que indica que los efectos de la valencia de pMHC no son significativamente afectado por el volumen de NP.
En conjunto, estos datos demuestran que las NP recubiertas con pMHC adquieren una potente actividad agonista por encima de un cierto umbral de valencia de pMHC (entre 9 y 11 pMHC/NP). Los aumentos en la valencia de pMHC o en la densidad de NP pueden mejorar las propiedades agonísticas de los pMHC-NP que llevan valencias de "umbral" o "supra-umbral" de pMHC, pero no las propiedades agonistas de las NP que llevan valencias de pMHC de "infra-umbral".

V. Actividad agonista versus tamaño y densidad de NP

Un análisis adicional indicó que el contenido total de pMHC no es el único factor que afecta la actividad agonista de pMHC-NP *in vitro* y que el tamaño de NP también juega un papel independiente importante. Esto se investigó comparando la actividad agonista de dos muestras de pMHC-GNP de diferente tamaño (14 y 40 nm de diámetro, respectivamente) y diferentes valencias de pMHC pero en condiciones de contenido de pMHC total similar. En el experimento que se muestra en la Figura 25, se utilizaron GNP de 14 nm que transportan ~ 200 moléculas de pMHC/GNP, y GNP de 40 nm que transportan ~ 5000 pMHC/GNP. Las densidades de GNP de estas dos muestras se ajustaron (a 3×10^{13} y 10^{12} GNP/ml, respectivamente) para ajustar el contenido total de pMHC en cada muestra a ~450 µg/ml. En particular, las células T 8.3-CD8+ respondieron significativamente mejor al compuesto pMHC/GNP de 14 nm que al compuesto de 40 nm en un intervalo de contenido total de pMHC, a pesar de que estas últimas estaban decoradas con significativamente más complejos de pMHC que las primeras. Esto sugirió que la densidad de GNP (más GNP/células T afines) es clave. En otras palabras, las NP de 4x40 nm con 1000 pMHC/GNP (4000 pMHC) serían menos deseables que las NP de 40×10 nm con 100 pMHC/GNP (4000 pMHC). Por lo tanto, cuando se toman en conjunto, estos datos sugieren que las preparaciones óptimas de pMHC-GNP son aquellas compuestas por pequeños GNP utilizados a altas densidades de pMHC. El aumento de la valencia de pMHC en estos pequeños NP aumenta aún más sus sorprendentes e inesperadas propiedades agonísticas.

VI. Actividad agonista versus exposición a pMHC

Como se señaló anteriormente, las muestras de GNP recubiertas con pMHC se producen co-recubriendo las GNP con un ligador de tiol-PEG-NH_2 de 3,4 kD (como aceptor del extremo carboxilo terminal de pMHC) con un ligador de tiol-PEG que funciona como estabilizador de GNP. Para investigar si la longitud del ligador tiol-PEG de estabilización influye en sus propiedades antiagregación de GNP, se comparó la capacidad del ligador tiol-PEG-NH_2 para unir moléculas pMHC y/o las propiedades agonísticas de GNP recubiertos con pMHC, GNP recubiertos con pMHC preparado usando ligadores estabilizadores de diferentes tamaños (2 kD y 5 kD, más cortos y más largos que el ligador aceptor pMHC, respectivamente). Se descubrió que ambos ligadores tenían propiedades antiagregación similares, y que el ligador de 5 kD no inhibía la unión de pMHC al ligador más corto de 3,4 kD de tiol-PEG-NH_2. Notablemente, sin embargo, los pMHC-GNP que estaban protegidos por el tiol-PEG más corto (2 kD) tenían una actividad agonista superior *in vitro* que aquellos co-recubiertos con el tiol-PEG más largo (5 kD) (Figura 26). Esto sugiere que los ligadores de tiol-PEG protectores largos protegen las moléculas de pMHC unidas al ligador aceptor de la exposición a las células T afines.

VII. Pequeñas NP acoplados covalentemente a altas densidades de pMHC proporcionan los máximos efectos de expansión de células T autorreguladoras *in vivo*

Se prepararon nanopartículas que tenían un diámetro medio de aproximadamente 10 nm y se acoplaron a NRP-V7/K^d (también denominado $IGRP_{206-214}$- K^d) o TUM/K^d (control) de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva, y probados por su capacidad para inducir la expansión de células T CD8+ autorreguladoras afines *in vivo*. La Figura 27 muestra los resultados de un experimento en el que se inyectaron antígeno-MHC-GNP por vía intravenosa en ratones NOD de tipo salvaje de 10 semanas de edad, quincenalmente durante 5 semanas consecutivas. Los cambios en el tamaño de la población de células T afines en la circulación y los diferentes tejidos linfoides en respuesta a la terapia se evaluaron mediante tinción de suspensiones celulares con tetrámeros de antígeno-MHC marcados con fluorescencia (tanto tetrámeros de control afines como irrelevantes). La administración de 10-100 menos GNP de lo que se ha demostrado previamente en la técnica (consulte, por ejemplo, Tsai et al., Immunity, 2010 en el que se probaron

nanopartículas recubiertas con 1-8 pMHC) pero recubiertas con 150 antígenos-MHC por GNP resultó en expansiones sustancialmente más altas (Figura 27). Expandieron las células T CD8+ *in vivo* a niveles varias veces más altos (hasta el 44% de todas las células T CD8+ circulantes) que las que normalmente obtenemos con nanopartículas recubiertas con un pMHC a una valencia de aproximadamente 8 (1-2% de células en sangre; véase, por ejemplo, Tsai et al., Immunity, 2010, Figura 1C). Los datos anteriores indican que las pequeñas nanopartículas recubiertas con altas valencias de antígeno-MHC proporcionan los máximos efectos de expansión de las células T. Estos resultados fueron inesperados. Por consiguiente, no es la avidez general de la interacción de las células pMHC-NP-T la responsable del efecto terapéutico, sino más bien la avidez de la población precursora que da lugar a las células T que se expanden en respuesta a la terapia con pMHC-NP. Esta interpretación es consistente con los datos descritos en la presente memoria descriptiva e implica que la valencia de pMHC en NP debería aumentar la eficacia terapéutica de pMHC-NP.

Ejemplo 4

Gran expansión de las células T CD8+ afines por pMHC-GNP recubiertos con valencias de pMHC más altas. A continuación, se determinó si los pMHC-NP tienen el potencial de inducir expansiones masivas de células T afines *in vivo*. Esto se realizó tratando ratones con varias inyecciones de 3×10^{12} NP de 10-14 nm que llevaban 25 µg de pMHC total (~150 moléculas $IGRP_{206-214}$/Kd por cada NP). Como se muestra en la Figura 28, los ratones tratados con 10 dosis (dos veces por semana durante 10 semanas) mostraron expansiones masivas de células T CD8+ reactivas $IGRP_{206-214}$ (NRP-V7) en sangre periférica en comparación con sus contrapartes no tratadas (de < 0,4 a > 17 o 47% de células T CD8+) (paneles inferiores). Tal expansión ya se observó en un ratón que fue sacrificado después de 4 dosis de pMHC-NP (paneles superiores). Las células expandidas con pMHC-NP se unieron específicamente a tetrámeros de pMHC afines, pero no a tetrámeros de pMHC no afines (NRP-V7/K^d frente a TUM/K^d, respectivamente).

Ejemplo 5

Preparación de nanopartículas de oro conjugadas con pMHC

Preparación de nanopartículas de oro conjugadas con pMHC (pMHC-GNP, 12 y 30 nm). Preparación de GNP. Las GNP se prepararon calentando agua D.D. (200 ml) en un matraz de bolas en un baño de aceite de silicio hasta que hierva. Luego se añadió una solución de $HAuCL_4$ al 1% (4 ml) en agua hirviendo. La solución se agitó durante 10 minutos antes de añadir una solución de citrato de Na al 1%. Para GNP de 12 nm, se añadieron 12 ml de solución de citrato de Na. Para GNP de 30 nm, se añadieron 12 ml de solución de citrato de Na. Aparece un color vino inmediatamente después de agregar la solución de citrato de Na. Para completar la reacción, la solución de GNP se agitó durante 30 minutos más. Esta es una modificación del procedimiento descrito en Levy, R. et al. "Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles" (Diseño racional y combinatorio de ligandos de protección de péptidos para nanopartículas de oro). J Am Chem Soc 126, 10076-84 (2004)).

Modificación superficial de las GNP. Las GNP se pegilaron mediante la adición de tiol-PEG-NH2 25 mM (M.W. 3400) y tiol-PEG 50 mM (M. W. 2000, relación PEG/GNP 10.000:1) en la solución de GNP. La solución se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente. Las GNP pegiladas se lavaron luego con 3 X 30 ml de agua D. D. esterilizada para eliminar el exceso de PEG, y se resuspendieron en 40 ml de tampón MES ($C_6H_{13}NO_4S.xH_2O$) 100 mM, pH 5,5.

Conjugación de pMHC. Se añadió pMHC ($IGRP_{206-214}$/Kd, 4 mg) a la solución de GNP pegiladas, gota a gota, con agitación suave a temperatura ambiente. La mezcla se agita durante una hora antes de la adición de 20 mg de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). La mezcla se agita durante 4 horas adicionales. Los conjugados de pMHC-GNP se lavan luego con 40 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2-7,4) durante tres veces y se resuspenden en 8 ml de PBS.

Ejemplo 6

Preparación de nanopartículas de oro conjugadas con pMHC

Preparación de GNP conjugadas con pMHC (pMHC-GNP, *2-10 nm*). *Preparación de las GNP (2-5 nm)*. Se prepararon GNP de 2-5 nm disolviendo 250 mg (para GNP de 2 nm) o 50 mg (para GNP de 4 nm) de **Dodecilamina** en 10 ml de solución de DDAB (bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB) 100 mM en tolueno). En segundo lugar, se disolvieron 100 mg de borohidruro de tetrabutilamonio (**TBAB**) en 4 ml de solución de DDAB. Las soluciones de dodecilamina y TBAB se mezclaron en un matraz de tres bocas de 50 ml, agitando bajo nitrógeno. Se resolvieron 34 mg de $AuCl_3$ en 4,5 ml de solución de DDAB y se inyectaron rápidamente en una mezcla de TBAB y solución de dodecilamina. La solución se vuelve rojo intenso inmediatamente, lo que indica la formación de GNP. La mezcla se agitó continuamente durante 30 minutos y se añadieron 15 ml de etanol a la mezcla. La mezcla se centrifugó a 4100 x g durante 12 minutos para precipitar las GNP.

Preparación de las GNP (6-10 nm). Para preparar GNP de 6-10 nm, primero se disolvió ácido decanoico(172 mg) en 10 ml de tolueno, y luego se mezcló con varias cantidades de solución de TBAB (4 y 1 ml para GNP de 6 y 10 nm, respectivamente) en un matraz de tres bocas de 50 ml, cuando se agita bajo nitrógeno. Luego se inyectó rápidamente $AuCl_3$ (34 mg disueltos en 4,5 ml de solución madre de DDAB) en la mezcla de TBAB y solución de ácido decanoico. La solución se volvió rojo intenso de inmediato. La mezcla se agitó continuamente durante 30 minutos y se añadieron 15 ml de etanol a la mezcla. La mezcla se centrifuga a 4100 x g durante 12 minutos para precipitar las GNP.

Modificación superficial de las GNP. Las GNP se resuspendieron en 20 ml de ácido mercaptopropanoico (MPA) 0,1 M en metanol, pH 10 y se agitaron durante una hora a temperatura ambiente. Luego se añadieron 10 ml de acetato de etilo. La mezcla se centrifugó a 4100 x g durante 15 minutos. Las GNP precipitadas se lavaron

luego con 30 ml de agua D.D. tres veces y se resuspendió en 20 ml de tampón MES 100 mM ($C_6H_{13}NO_4S.xH_2O$), pH 5,5. A esta mezcla, se agregaron soluciones de polioxietilen bis(amina) 0,5 M (a una relación 10.000/1 PEG/GNP) y 0,1 M 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (concentración final de EDC 2 mM). La mezcla se agitó entonces durante 4 horas. Las GNP pegiladas se lavaron con 3 X 30 ml de agua D.D. para eliminar el exceso de PEG y EDC.

Conjugación de pMHC. Las GNP pegiladas se resuspendieron en 20 ml de tampón MES 100 mM ($C_6H_{13}NO_4S.xH_2O$), pH 5,5. Luego se agregaron pMHC (5 mg/ml, total 10-30 mg) a GNP resuspendidos (relación 500:1 pMHC/GNP), gota a gota, y se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente antes de agregar 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 0,1 M (concentración final de EDC 2 mM). La mezcla se agitó durante 4 horas más. Los conjugados de pMHC-GNP se lavaron tres con 40 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2-7,4), y luego se resuspendieron en 10-20 ml de PBS.

Debe entenderse que, aunque la presente invención ha sido descrita específicamente mediante realizaciones preferentes y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a la modificación, mejora y variación de las invenciones descritas en la presente memoria, y que tales modificaciones, mejoras y variaciones se consideran dentro del alcance de la presente invención. Los materiales, procedimientos y ejemplos aquí proporcionados son representativos de realizaciones preferentes, son ejemplares y no pretenden ser limitaciones del alcance de la invención.

La invención se ha sido descrita de manera amplia y genérica en la presente memoria descriptiva. Cada una de las especies más reducidas y agrupaciones subgenéricas que caen dentro de la descripción genérica también forman parte de la invención. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una condición o limitación negativa que elimine cualquier materia objeto del género, independientemente de si el material extirpado se mencione específicamente o no en la presente memoria descriptiva.

Además, cuando las características o aspectos de la invención se describan en términos de grupos Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la invención también se describe en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush.

Listado de secuencias

<110> UTI Limited Partnership

<120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFLAMACIÓN

<130> UTI-C-P1531PCT

<150> 61/615,743
<151> 2012-03-26

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Bacteroides vulgatus

<400> 1

```
Ile Tyr Leu Lys Thr Asn Val Tyr Leu
1               5
```

<210> 2
<211> 407
<212> PRT
<213> Bacteroides vulgatus

<400> 2

```
Met Leu Glu Lys Ile Arg Tyr Arg Leu Val Phe Asn Arg Gln Lys Lys
1               5                  10                  15

Leu Asn Lys Gln Gly Thr Ala Leu Val Gln Val Glu Ala Tyr Leu Asn
            20                  25                  30

Gln Arg Lys Ile Tyr Leu Lys Thr Asn Val Tyr Leu Lys Pro Glu Cys
        35                  40                  45

Trp Ser Arg Glu Gly Ala Gln Val Ile Asn His Pro Gln Ser Asn Glu
    50                  55                  60

Leu Asn Ala Met Leu Tyr Glu Tyr Ile Leu Tyr Leu Gln Gly Ile Glu
65                  70                  75                  80

Leu Gly Tyr Trp Lys Arg Gly Ile Pro Ala Thr Leu Ser Leu Leu Lys
                85                  90                  95

Asp Ala Val Lys Lys Lys Ser Ala Val Asn Val Ser Phe Ser Thr Phe
            100                 105                 110

Ala Lys Ser Ala Ile Asp Asn Ser Asp Lys Lys Gln Ser Thr Lys Asp
        115                 120                 125

Asn Leu His Ser Thr Leu Ala Val Leu Asn Asp Phe Arg Ser Gly Leu
    130                 135                 140

Asp Phe Lys Asp Leu Thr Tyr Thr Phe Leu Arg Asp Phe Glu Gln Tyr
145                 150                 155                 160

Leu Arg Glu Lys Gly Asn Ala Val Asn Thr Ile Ala Lys His Met Arg
                165                 170                 175

Gln Leu Arg Thr Leu Val Asn Glu Ala Ile Asn Gln Gly Tyr Met His
            180                 185                 190

Ala Asp Ala Tyr Pro Phe Arg Lys Tyr Lys Ile Lys Gln Glu Lys Gly
        195                 200                 205
```

```
Arg His Glu Phe Leu Thr Pro Asp Glu Leu Lys Lys Leu Glu Thr Val
    210                 215                 220

Glu Val Glu Glu Lys Ser Met Arg His Val Leu Asp Ala Phe Leu Phe
225                 230                 235                 240

Cys Cys Tyr Thr Gly Leu Arg Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Leu Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Asn Phe Ile Arg Val Asn Gly Lys Arg Trp Leu Tyr Phe Lys Ser
            260                 265                 270

Val Lys Thr Gly Val Glu Ile Arg Leu Pro Leu His Leu Leu Phe Glu
        275                 280                 285

Ser Arg Ala Leu Gly Ile Leu Asp Arg Tyr Pro Asp Ile Gly Ser Leu
    290                 295                 300

Val Ser Leu Pro Cys Asn Ser Glu Val Asn Lys Gln Leu Arg Lys Leu
305                 310                 315                 320

Thr Gly Leu Cys Gly Ile Lys Lys Arg Ile Thr Tyr His Val Ser Arg
                325                 330                 335

His Thr Cys Ala Thr Leu Leu Val His Gln Gly Val Ala Ile Thr Thr
            340                 345                 350

Val Gln Lys Leu Leu Gly His Thr Ser Val Lys Thr Thr Gln Ile Tyr
        355                 360                 365

Ser Glu Val Leu Ser Ser Thr Ile Val Arg Asp Leu Lys Asn Val Gln
    370                 375                 380

Arg Lys Arg Lys Lys Val Lys Met Phe Pro Asp Lys Gly Leu Arg Thr
385                 390                 395                 400

Ser Asp Phe Ile Asp Asn Arg
                405
```

<210> 3
<211> 1224
<212> ADN
<213> Bacteroides vulgatus
<400> 3

atgctagaga agatacgata caggttggtc tttaaccgcc aaaagaaact gaataagcaa 60

ggcacggccc ttgtacaggt tgaagcctat ttgaaccaaa ggaaaatcta cctgaagacc 120

aatgtttacc tcaaaccgga gtgctggagc cgtgaggggg cacaagtcat taaccacccc 180

caatctaacg aactcaacgc aatgctctat gaatacatcc tgtatctgca aggcatagag 240

ttggggtatt ggaagcgcgg aatacctgcc acactctcac tactgaagga tgctgtcaag 300

aagaaaagtg ccgtgaatgt cagcttctcc actttcgcca aatcagccat tgacaattcg 360

gacaagaagc agtccaccaa ggacaacctg cactcgacac tggcggtcct gaatgacttc 420

cgttccggat tggacttcaa ggatcttacc tatacattcc ttcgtgattt tgagcaatat 480

ttaagggaaa agggcaatgc ggtcaatacg atagccaagc acatgagaca gctccgtacc 540

ttggtcaatg aggcaatcaa ccagggatat atgcacgcgg acgcttatcc gttcagaaag 600

tacaaaatca aacaggagaa aggcagacat gagtttctta ccccggacga gctgaagaag 660

ctggaaacgg tcgaagtgga agagaagtcc atgcgccatg tgctcgatgc cttcctgttc 720

tgctgttata ccggattgcg ctattctgac ttctgccagc tcacacctga gaatttcatt 780

agagtaaacg gcaaacggtg gctgtacttc aaatccgtca agacaggggt ggaaatccgt 840

ctgccgttac atctgctgtt tgaaagcagg gcattgggca ttcttgaccg ttatccggat 900

ataggtagtc ttgtatccct accctgtaac tcggaagtga ataagcagct tcgaaagctg 960

accggattgt gtggtatcaa aaaacggata acctaccatg tgagccgtca tacctgtgcc 1020

accctgctgg ttcatcaggg agttgcgatt acaacagtcc agaagctgct cggacatact 1080

tccgtaaaga ccacacagat ttattcggag gtactttcca gcaccattgt gcgtgacttg 1140

aaaaatgttc aaaggaaaag gaaaaaagta aagatgtttc ctgataaagg cttgagaaca 1200

tctgatttta tagacaaccg gtag 1224

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Bacteroides vulgatus

<400> 4

Thr Asn Val Tyr Leu Lys Pro Glu Cys Trp Ser Arg Glu Gly Ala
1 5 10 15

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> Bacteroides vulgatus

<400> 5

Leu Gly Tyr Trp Lys Arg Gly Ile Pro Ala Thr Leu Ser Leu Leu
1 5 10 15

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Bacteroides vulgatus

<400> 6

Thr Gln Ile Tyr Ser Glu Val Leu Ser Ser Thr Ile Val Arg Asp
1 5 10 15

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Bacteroides vulgatus

<400> 7

Ile Asn His Pro Gln Ser Asn Glu Leu Asn Ala Met Leu Tyr Glu
1 5 10 15

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> Bacteroides vulgatus

<400> 8

Ile Pro Ala Thr Leu Ser Leu Leu Lys Asp Ala Val Lys Lys Lys
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula que comprende un complejo antígeno-MHC, en la que:

(a) el complejo antígeno-MHC comprende una proteína MHC complejada con un péptido antigénico de integrasa *de Bacteroides vulgatus*;
(b) la nanopartícula tiene un diámetro de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm; y
(c) la relación del complejo antígeno-MHC por nanopartícula es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1000:1**.**

2. La nanopartícula según la reivindicación 1, en la que la nanopartícula tiene un diámetro seleccionado de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 50 nm o de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 15 nm.

3. La nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la nanopartícula comprende además una capa biodegradable en la superficie externa de la nanopartícula y los complejos antígeno-MHC están acoplados a la nanopartícula o a la capa biodegradable.

4. La nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la capa biodegradable comprende uno o más de dextrano, manitol o poli(etilenglicol).

5. La nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el complejo antígeno-MHC está unido covalentemente o no covalentemente a la nanopartícula.

6. La nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el complejo antígeno-MHC está unido covalentemente a la nanopartícula a través de un ligador de tamaño inferior a 5 kD.

7. La nanopartícula según la reivindicación 6, en la que el ligador comprende poli(etilen)glicol.

8. La nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la nanopartícula comprende un metal, un óxido metálico, un sulfuro metálico, un seleniuro metálico, un polímero o un material magnético.

9. La nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el antígeno comprende una secuencia peptídica del grupo: SEQ ID NO: 1, 4, 5, 6, 7 u 8.

10. La nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la nanopartícula es biocompatible o bioabsorbible o no liposomal.

11. La nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el MHC comprende una proteína MHC de clase I o MHC de clase II.

12. La nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que la nanopartícula comprende oro, hierro u óxido de hierro.

13. Una composición que comprende la nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y un vehículo.

14. Una cantidad eficaz de la nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para uso en un paciente que la necesite:

(a) en un procedimiento para el tratamiento de la inflamación, como la inflamación del tracto gastrointestinal; o
(b) en un procedimiento de acumulación de células T antiinflamatorias y/o células antiinflamatorias en el tracto GI.

15. Una cantidad eficaz de la nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para uso en un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad gastrointestinal del grupo: enfermedad inflamatoria intestinal, colitis, enfermedad de Crohn o inflamación alérgica del tracto gastrointestinal.

16. La nanopartícula para el uso según la reivindicación 15, en la que la célula T es una célula T CD4+ o una célula T CD8+, en particular la célula T secreta IL-10 o TGFβ.

17. Una cantidad eficaz de la nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para uso en un paciente que la necesite en un procedimiento para inducir una respuesta antiinflamatoria en una célula o un tejido.

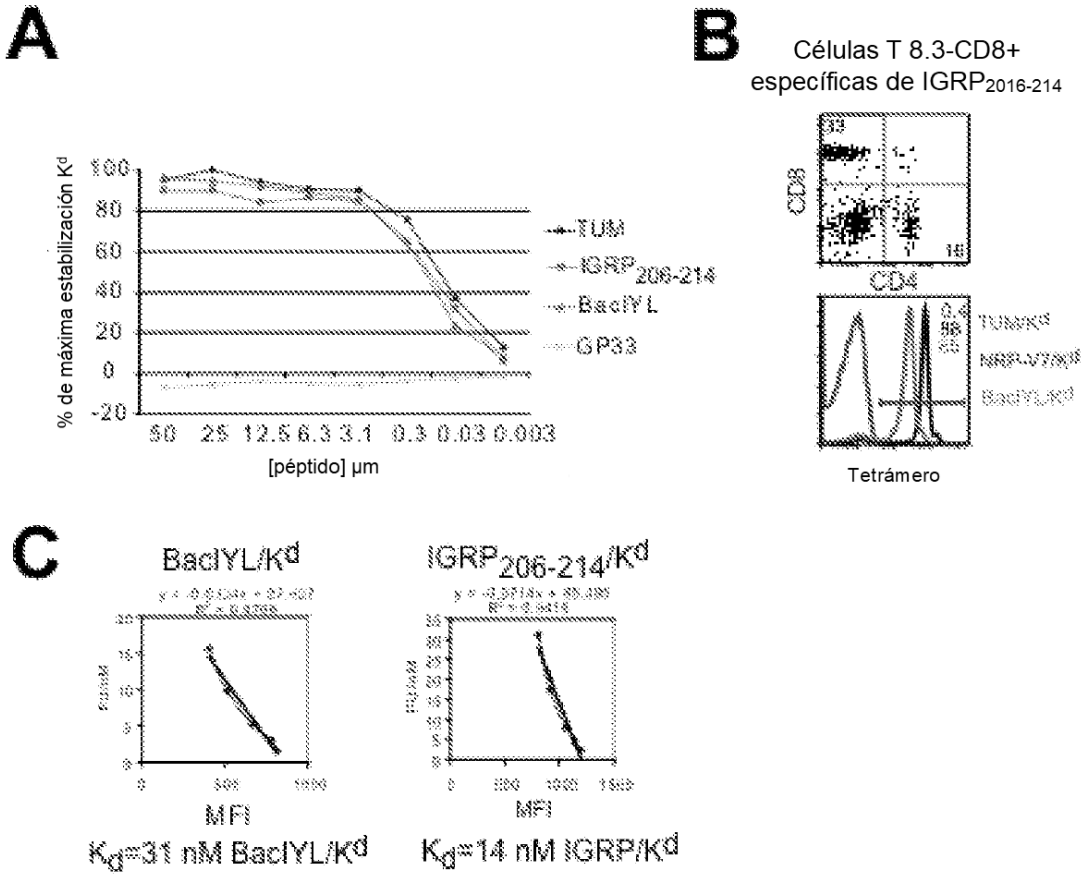

A
% de máxima estabilización Kd
100
80
60
40
20
0
-20
50 25 12.5 6.3 3.1 0.3 0.03 0.003
[péptido] µm
TUM
IGRP206-214
BaclYL
GP33
B
Células T 8.3-CD8+
específicas de IGRP2016-214
CD8
CD4
Tetrámero
C
BaclYL/Kd
IGRP206-214/Kd
MFI
MFI
Kd=31 nM BaclYL/Kd
Kd=14 nM IGRP/Kd

FIG. 1A-C

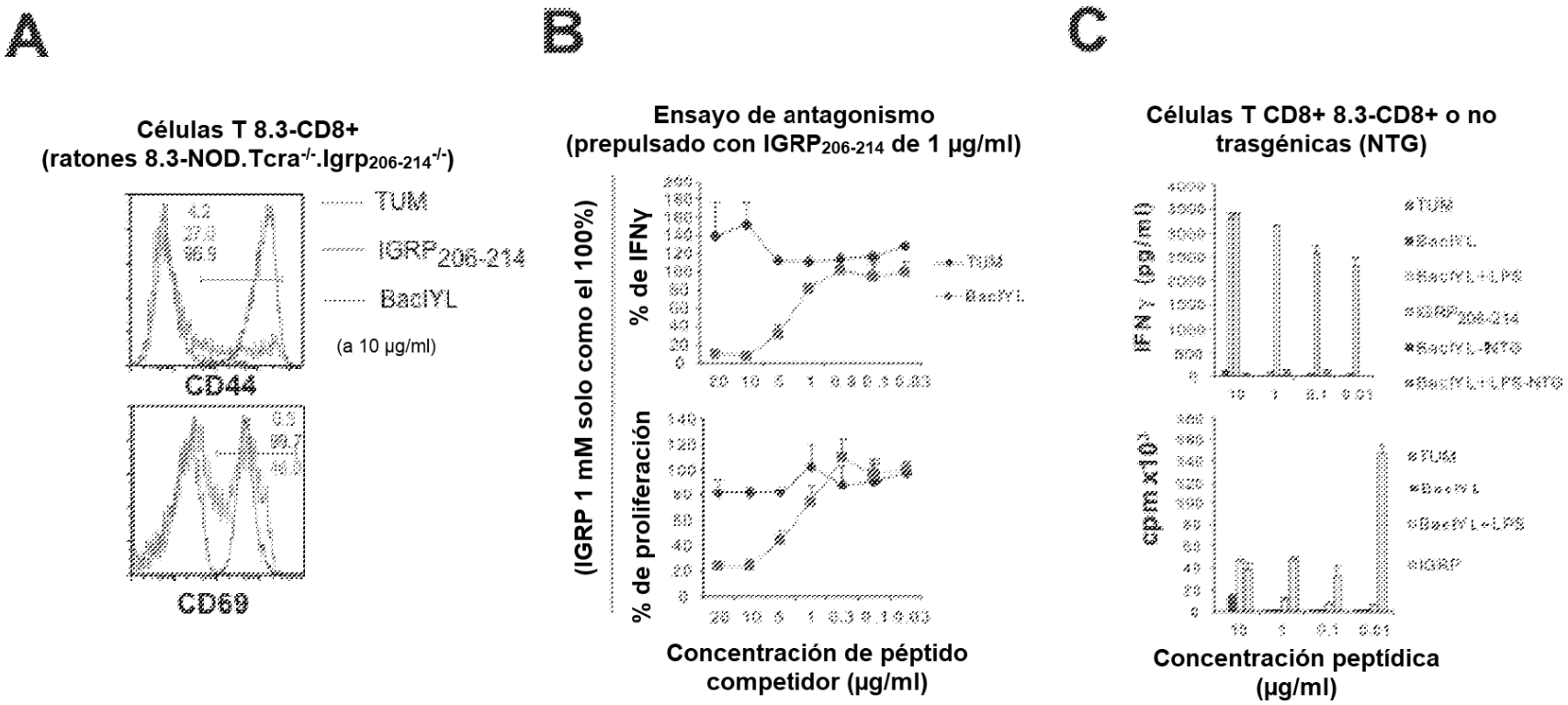

A
Células T 8.3-CD8+
(ratones 8.3-NOD.Tcra-/-.Igrp206-214-/-)
TUM
IGRP206-214
BacIYL
(a 10 µg/ml)
CD44
CD69
B
Ensayo de antagonismo
(prepulsado con IGRP206-214 de 1 µg/ml)
(IGRP 1 mM solo como el 100%)
% de IFNγ
% de proliferación
TUM
BacIYL
Concentración de péptido competidor (µg/ml)
C
Células T CD8+ 8.3-CD8+ o no trasgénicas (NTG)
IFN γ (pg/ml)
cpm x10³
TUM
BacIYL
BacIYL+LPS
IGRP206-214
BacIYL-NTG
BacIYL+LPS-NTG
IGRP
Concentración peptídica (µg/ml)

FIG. 2A-C

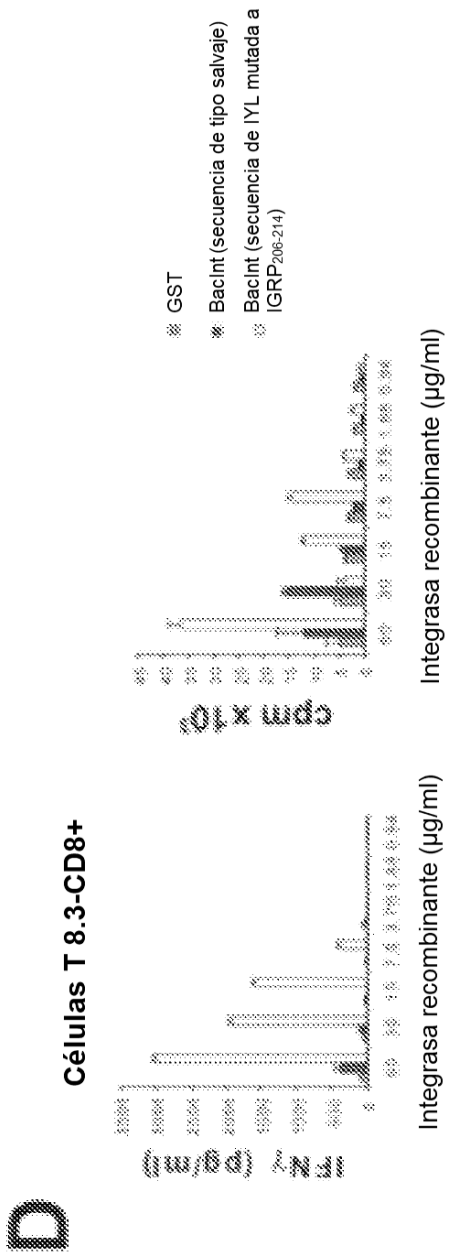

D
Células T 8.3-CD8+
IFNγ (pg/ml)
Integrasa recombinante (µg/ml)
cpm x 10³
Integrasa recombinante (µg/ml)
GST
BacInt (secuencia de tipo salvaje)
BacInt (secuencia de IYL mutada a IGRP206-214)

FIG. 2D

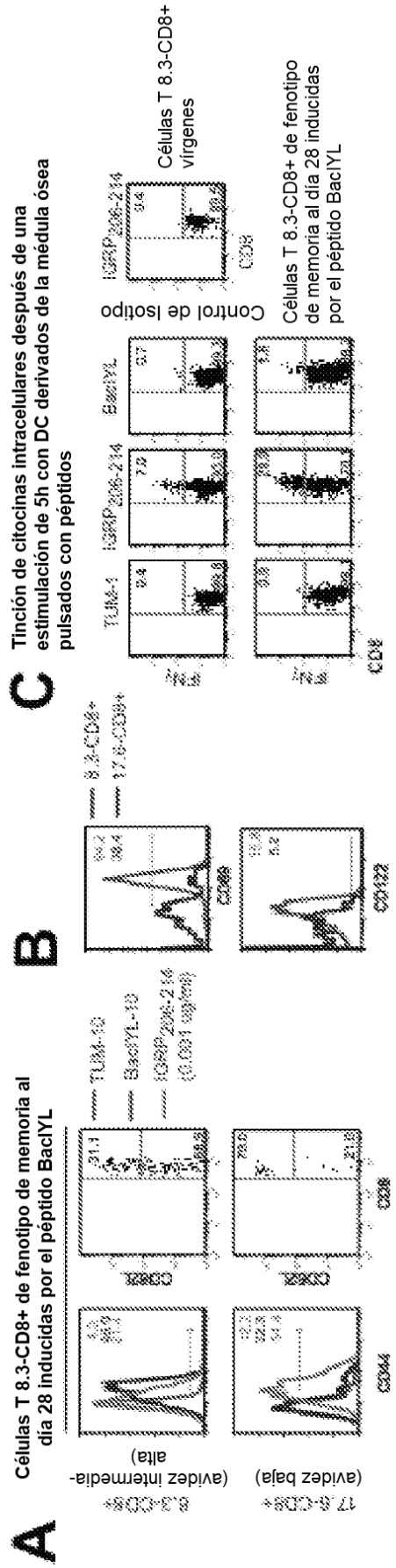

A
Células T 8.3-CD8+ de fenotipo de memoria al día 28 inducidas por el péptido BaclYL
8.3-CD8+ (avidez intermedia-alta)
17.6-CD8+ (avidez baja)
TUM-1
BaclYL-10
IGRP206-214 (0.001 µg/ml)
CD62L
CD28
CD44
B
8.3-CD8+
17.6-CD8+
CD8
CD122
C
Tinción de citocinas intracelulares después de una estimulación de 5h con DC derivados de la médula ósea pulsados con péptidos
TUM-1
IGRP206-214
BaclYL
Control de Isotipo
Células T 8.3-CD8+ de fenotipo de memoria al día 28 inducidas por el péptido BaclYL
Células T 8.3-CD8+ vírgenes
CD8

FIG. 3A-C

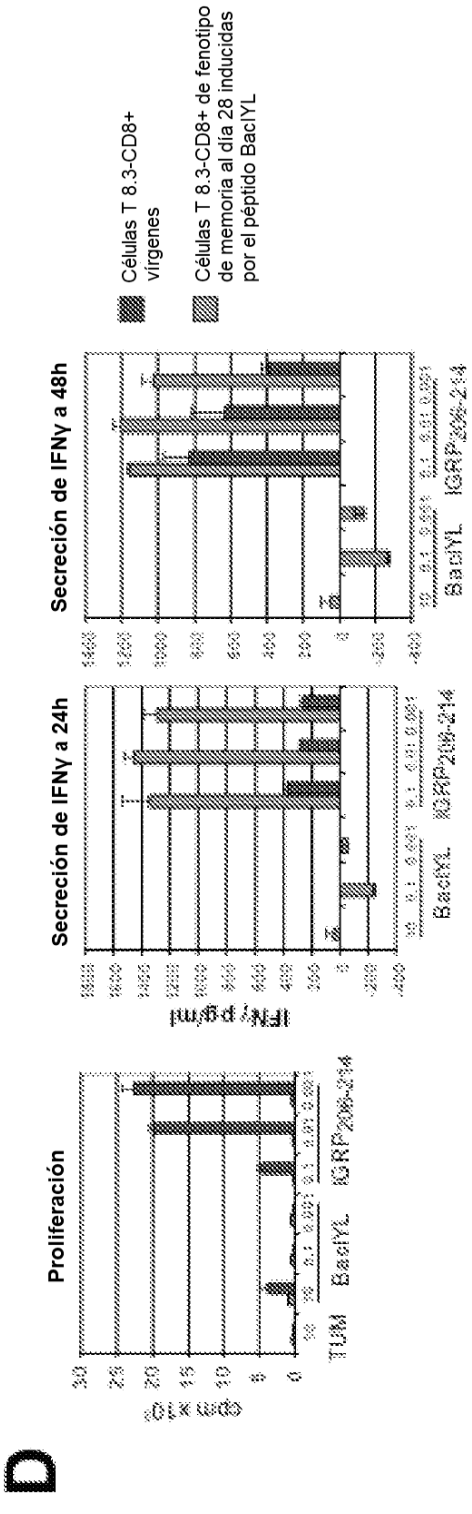

D
Proliferación
cpm x10³
30
25
20
15
10
5
0
TUM
BaclYL
IGRP206-214
Secreción de IFNγ a 24h
IFNγ pg/ml
Secreción de IFNγ a 48h
Células T 8.3-CD8+ vírgenes
Células T 8.3-CD8+ de fenotipo de memoria al día 28 inducidas por el péptido BaclYL

FIG. 3D

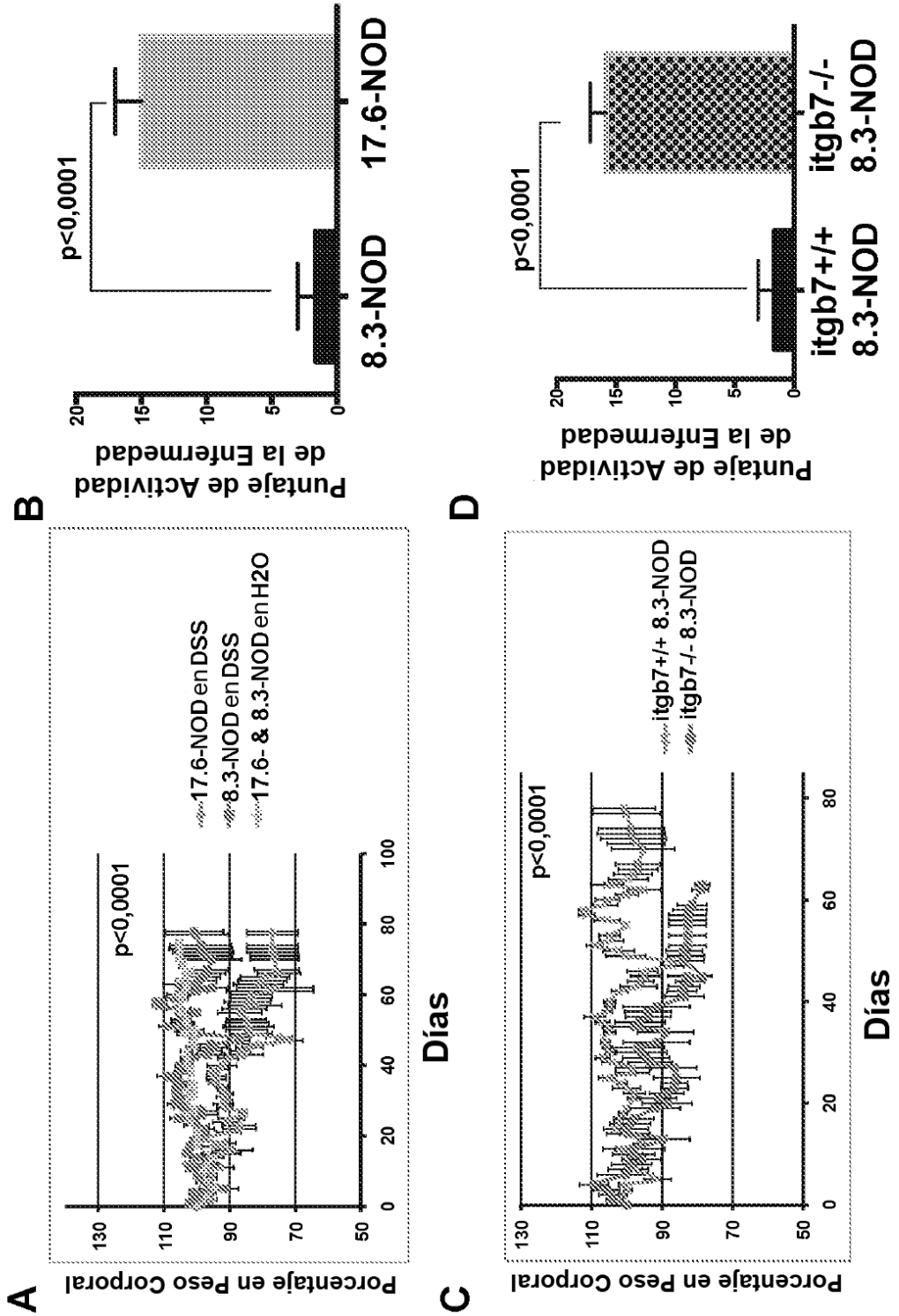

A
Porcentaje en Peso Corporal
130
110
90
70
50
0
20
40
60
80
100
p<0,0001
17.6-NOD en DSS
8.3-NOD en DSS
17.6- & 8.3-NOD en H2O
Días
B
Puntaje de Actividad de la Enfermedad
20
15
10
5
0
p<0,0001
8.3-NOD
17.6-NOD
C
Porcentaje en Peso Corporal
130
110
90
70
50
0
20
40
60
80
p<0,0001
itgb7+/+ 8.3-NOD
itgb7-/- 8.3-NOD
Días
D
Puntaje de Actividad de la Enfermedad
20
15
10
5
0
p<0,0001
itgb7+/+ 8.3-NOD
itgb7-/- 8.3-NOD

FIG. 4A-D

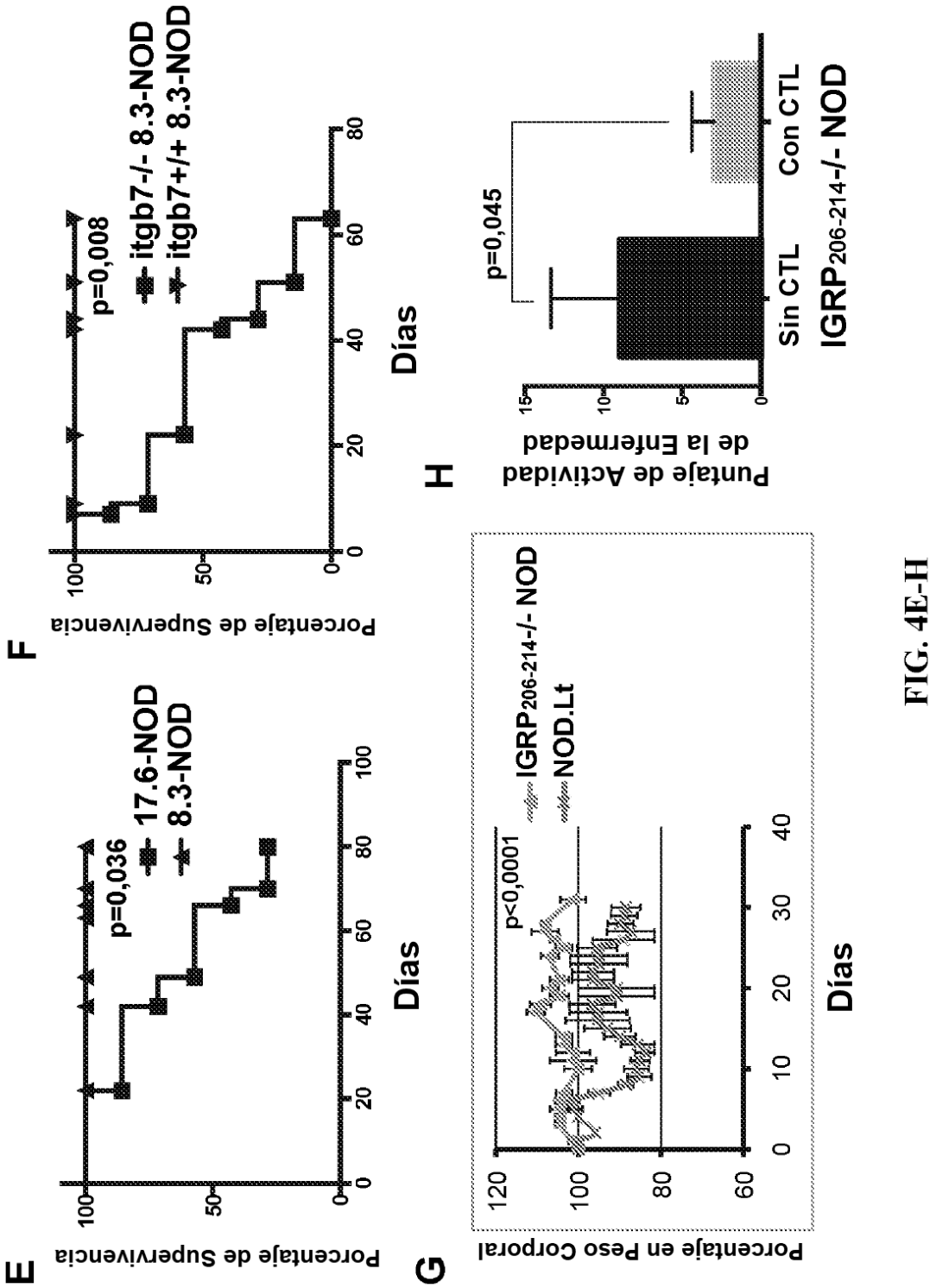
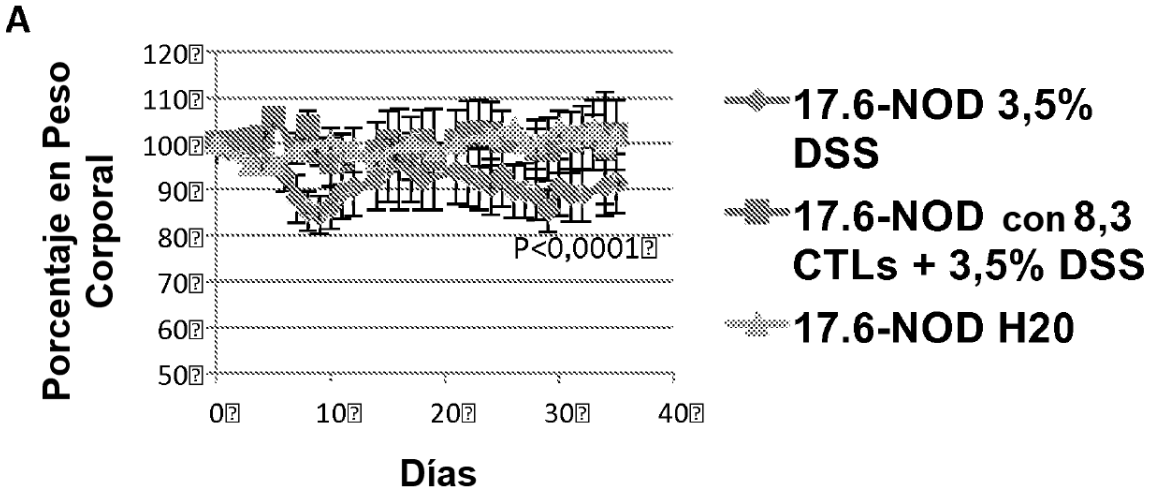

E
Porcentaje de Supervivencia
p=0,036
17.6-NOD
8.3-NOD
Días
F
Porcentaje de Supervivencia
p=0,008
itgb7-/- 8.3-NOD
itgb7+/+ 8.3-NOD
Días
G
Porcentaje en Peso Corporal
p<0,0001
IGRP206-214-/- NOD
NOD.Lt
Días
H
Puntaje de Actividad de la Enfermedad
p=0,045
Sin CTL
Con CTL
IGRP206-214-/- NOD

FIG. 4E-H


A
Porcentaje en Peso Corporal
120
110
100
90
80
70
60
50
0
10
20
30
40
Días
P<0,0001
17.6-NOD 3,5% DSS
17.6-NOD con 8,3 CTLs + 3,5% DSS
17.6-NOD H20

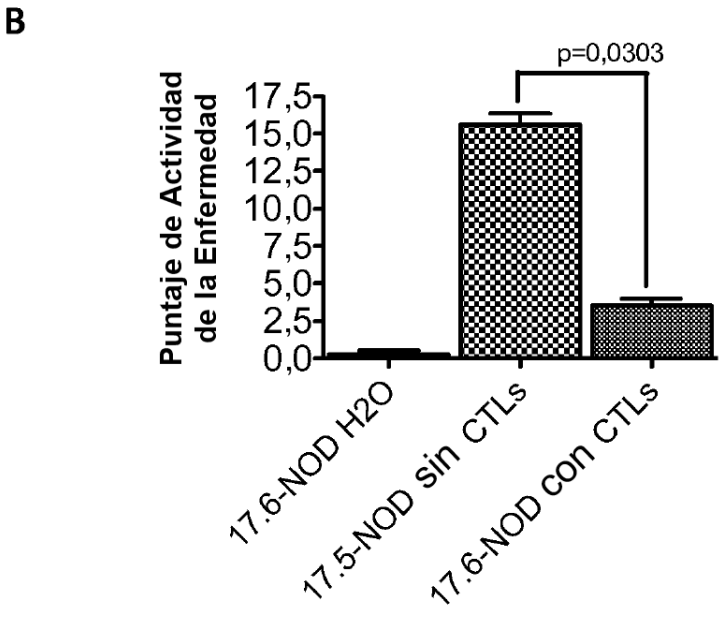

B
Puntaje de Actividad de la Enfermedad
17,5
15,0
12,5
10,0
7,5
5,0
2,5
0,0
p=0,0303
17.6-NOD H2O
17.5-NOD sin CTLs
17.6-NOD con CTLs

FIG. 5A-B

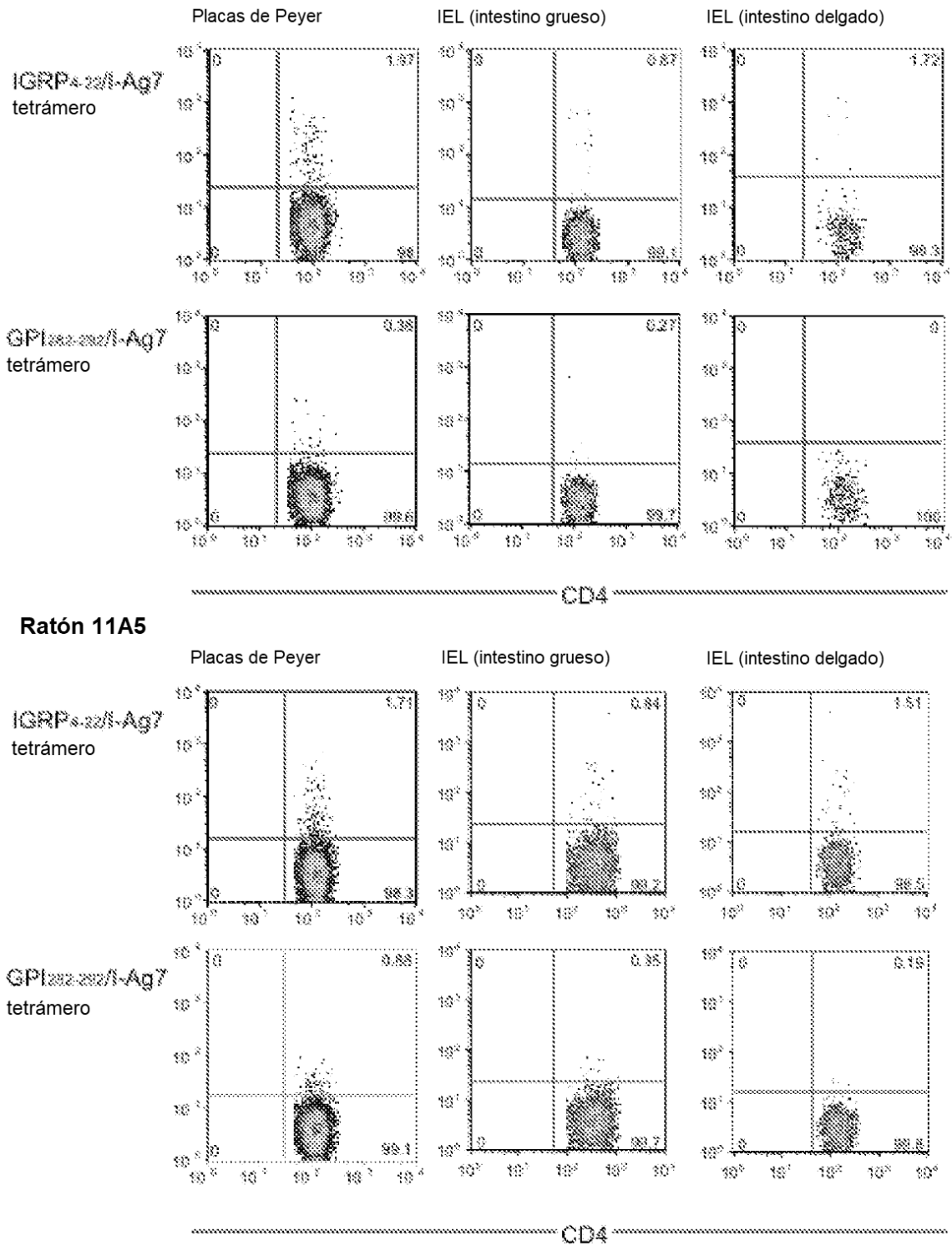

Ratón 13B4
Placas de Peyer
IEL (intestino grueso)
IEL (intestino delgado)
IGRP4-22/I-Ag7 tetrámero
GPI282-292/I-Ag7 tetrámero
CD4
Ratón 11A5
Placas de Peyer
IEL (intestino grueso)
IEL (intestino delgado)
IGRP4-22/I-Ag7 tetrámero
GPI282-292/I-Ag7 tetrámero
CD4

FIG. 6

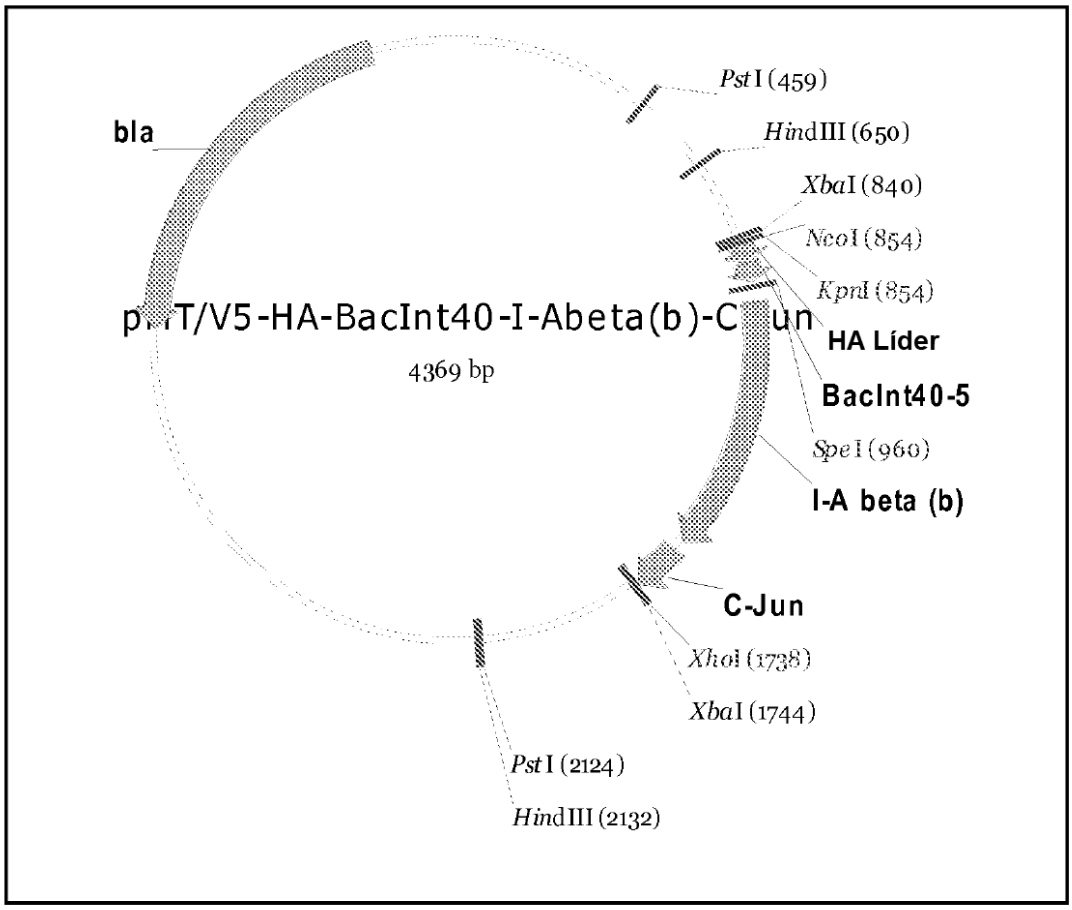

bla
PstI (459)
HindIII (650)
XbaI (840)
NcoI (854)
KpnI (854)
HA Líder
BacInt40-5
SpeI (960)
I-A beta (b)
C-Jun
XhoI (1738)
XbaI (1744)
PstI (2124)
HindIII (2132)
4369 bp

FIG. 7

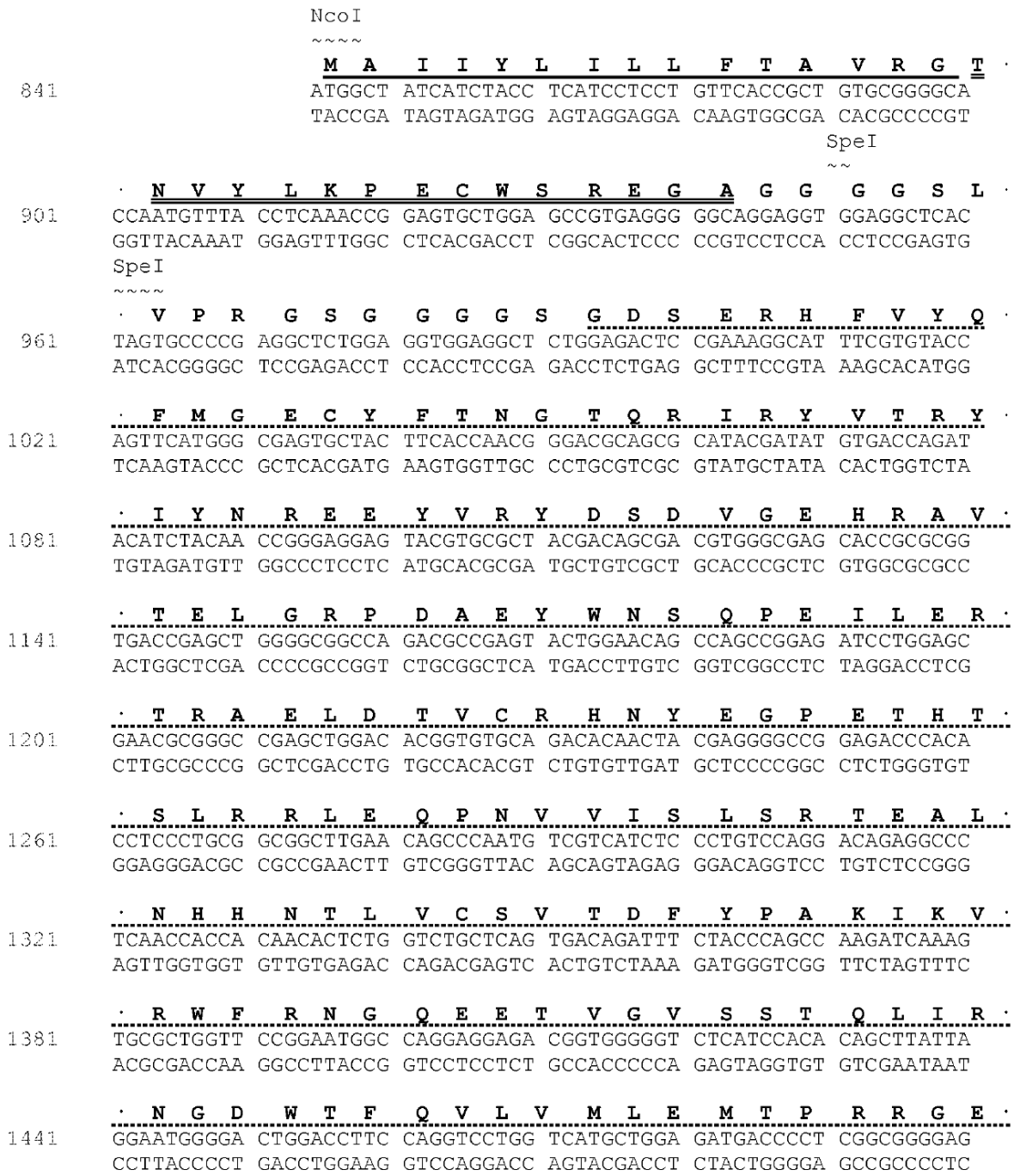

NcoI
M A I I Y L I L L F T A V R G T
841 ATGGCT ATCATCTACC TCATCCTCCT GTTCACCGCT GTGCGGGGCA
TACCGA TAGTAGATGG AGTAGGAGGA CAAGTGGCGA CACGCCCCGT
SpeI
N V Y L K P E C W S R E G A G G G G S L
901 CCAATGTTTA CCTCAAACCG GAGTGCTGGA GCCGTGAGGG GGCAGGAGGT GGAGGCTCAC
GGTTACAAAT GGAGTTTGGC CTCACGACCT CGGCACTCCC CCGTCCTCCA CCTCCGAGTG
SpeI
V P R G S G G G G S G D S E R H F V Y Q
961 TAGTGCCCCG AGGCTCTGGA GGTGGAGGCT CTGGAGACTC CGAAAGGCAT TTCGTGTACC
ATCACGGGGC TCCGAGACCT CCACCTCCGA GACCTCTGAG GCTTTCCGTA AAGCACATGG
F M G E C Y F T N G T Q R I R Y V T R Y
1021 AGTTCATGGG CGAGTGCTAC TTCACCAACG GGACGCAGCG CATACGATAT GTGACCAGAT
TCAAGTACCC GCTCACGATG AAGTGGTTGC CCTGCGTCGC GTATGCTATA CACTGGTCTA
I Y N R E E Y V R Y D S D V G E H R A V
1081 ACATCTACAA CCGGGAGGAG TACGTGCGCT ACGACAGCGA CGTGGGCGAG CACCGCGCGG
TGTAGATGTT GGCCCTCCTC ATGCACGCGA TGCTGTCGCT GCACCCGCTC GTGGCGCGCC
T E L G R P D A E Y W N S Q P E I L E R
1141 TGACCGAGCT GGGGCGGCCA GACGCCGAGT ACTGGAACAG CCAGCCGGAG ATCCTGGAGC
ACTGGCTCGA CCCCGCCGGT CTGCGGCTCA TGACCTTGTC GGTCGGCCTC TAGGACCTCG
T R A E L D T V C R H N Y E G P E T H T
1201 GAACGCGGGC CGAGCTGGAC ACGGTGTGCA GACACAACTA CGAGGGGCCG GAGACCCACA
CTTGCGCCCG GCTCGACCTG TGCCACACGT CTGTGTTGAT GCTCCCCGGC CTCTGGGTGT
S L R R L E Q P N V V I S L S R T E A L
1261 CCTCCCTGCG GCGGCTTGAA CAGCCCAATG TCGTCATCTC CCTGTCCAGG ACAGAGGCCC
GGAGGGACGC CGCCGAACTT GTCGGGTTAC AGCAGTAGAG GGACAGGTCC TGTCTCCGGG
N H H N T L V C S V T D F Y P A K I K V
1321 TCAACCACCA CAACACTCTG GTCTGCTCAG TGACAGATTT CTACCCAGCC AAGATCAAAG
AGTTGGTGGT GTTGTGAGAC CAGACGAGTC ACTGTCTAAA GATGGGTCGG TTCTAGTTTC
R W F R N G Q E E T V G V S S T Q L I R
1381 TGCGCTGGTT CCGGAATGGC CAGGAGGAGA CGGTGGGGGT CTCATCCACA CAGCTTATTA
ACGCGACCAA GGCCTTACCG GTCCTCCTCT GCCACCCCCA GAGTAGGTGT GTCGAATAAT
N G D W T F Q V L V M L E M T P R R G E
1441 GGAATGGGGA CTGGACCTTC CAGGTCCTGG TCATGCTGGA GATGACCCCT CGGCGGGGAG
CCTTACCCCT GACCTGGAAG GTCCAGGACC AGTACGACCT CTACTGGGGA GCCGCCCCTC

FIG. 8

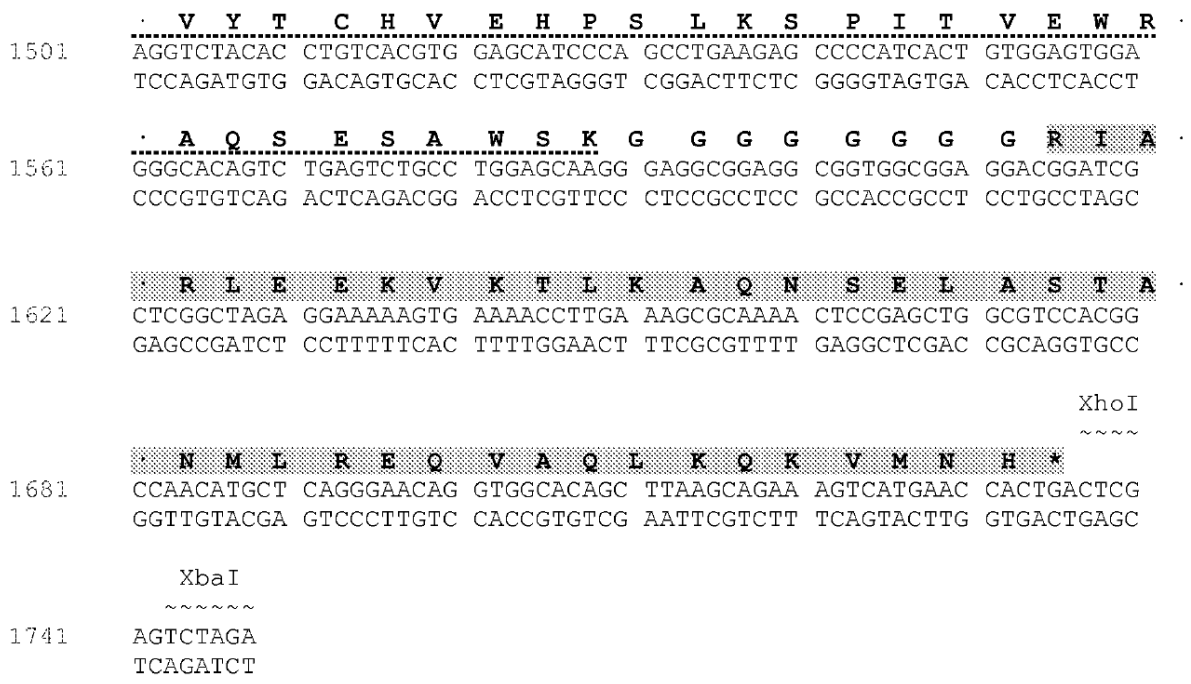


FIG. 8 (continuación)

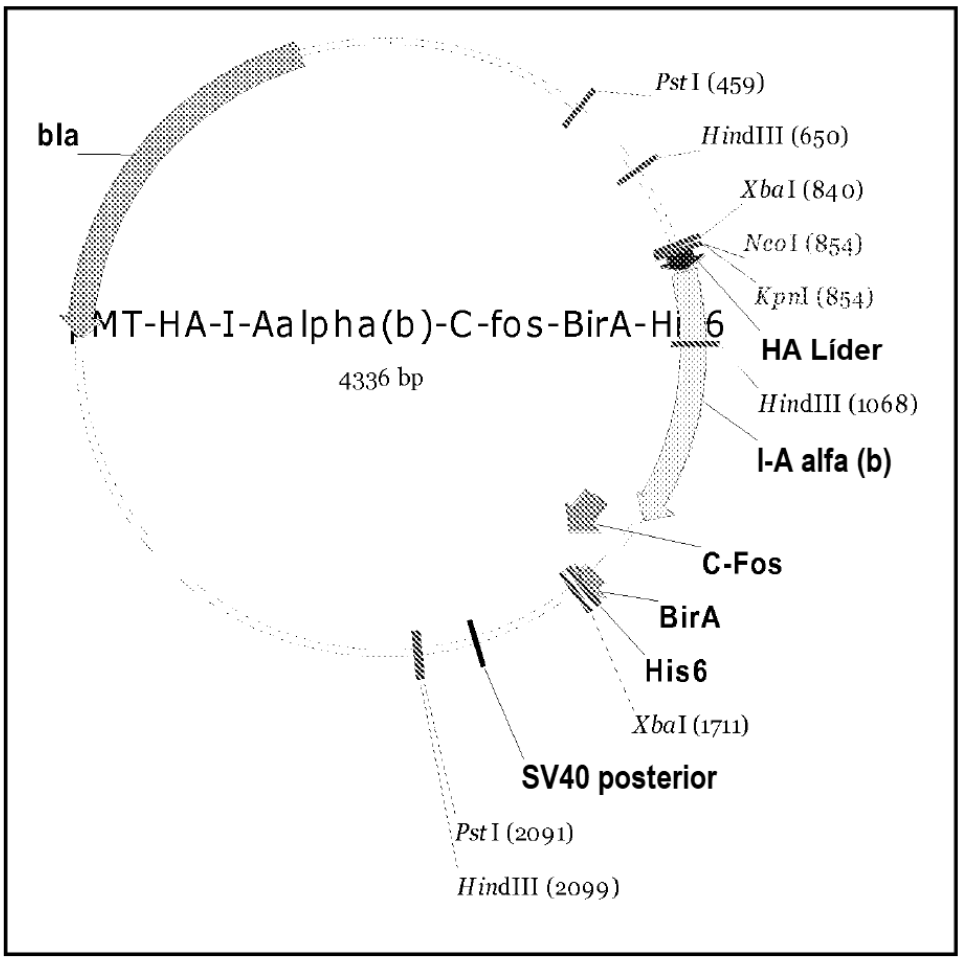

bla
pMT-HA-I-Aalpha(b)-C-fos-BirA-Hi 6
4336 bp
Pst I (459)
HindIII (650)
XbaI (840)
NcoI (854)
KpnI (854)
HA Líder
HindIII (1068)
I-A alfa (b)
C-Fos
BirA
His6
XbaI (1711)
SV40 posterior
Pst I (2091)
HindIII (2099)

FIG. 9

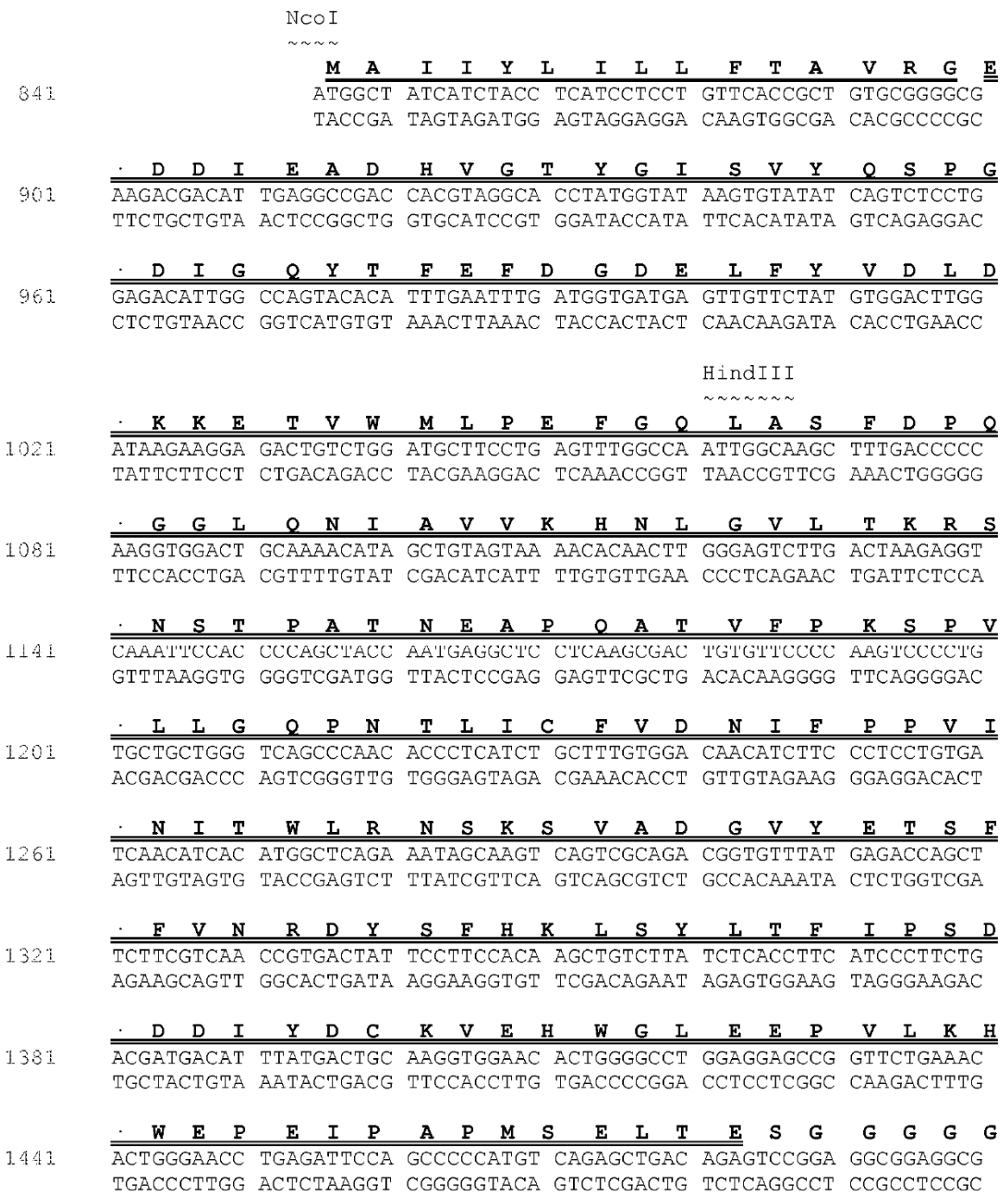

NcoI
M A I I Y L I L L F T A V R G E
841 ATGGCT ATCATCTACC TCATCCTCCT GTTCACCGCT GTGCGGGGCG
TACCGA TAGTAGATGG AGTAGGAGGA CAAGTGGCGA CACGCCCCGC
D D I E A D H V G T Y G I S V Y Q S P G
901 AAGACGACAT TGAGGCCGAC CACGTAGGCA CCTATGGTAT AAGTGTATAT CAGTCTCCTG
TTCTGCTGTA ACTCCGGCTG GTGCATCCGT GGATACCATA TTCACATATA GTCAGAGGAC
D I G Q Y T F E F D G D E L F Y V D L D
961 GAGACATTGG CCAGTACACA TTTGAATTTG ATGGTGATGA GTTGTTCTAT GTGGACTTGG
CTCTGTAACC GGTCATGTGT AAACTTAAAC TACCACTACT CAACAAGATA CACCTGAACC
HindIII
K K E T V W M L P E F G Q L A S F D P Q
1021 ATAAGAAGGA GACTGTCTGG ATGCTTCCTG AGTTTGGCCA ATTGGCAAGC TTTGACCCCC
TATTCTTCCT CTGACAGACC TACGAAGGAC TCAAACCGGT TAACCGTTCG AAACTGGGGG
G G L Q N I A V V K H N L G V L T K R S
1081 AAGGTGGACT GCAAAACATA GCTGTAGTAA AACACAACTT GGGAGTCTTG ACTAAGAGGT
TTCCACCTGA CGTTTTGTAT CGACATCATT TTGTGTTGAA CCCTCAGAAC TGATTCTCCA
N S T P A T N E A P Q A T V F P K S P V
1141 CAAATTCCAC CCCAGCTACC AATGAGGCTC CTCAAGCGAC TGTGTTCCCC AAGTCCCCTG
GTTTAAGGTG GGGTCGATGG TTACTCCGAG GAGTTCGCTG ACACAAGGGG TTCAGGGGAC
L L G Q P N T L I C F V D N I F P P V I
1201 TGCTGCTGGG TCAGCCCAAC ACCCTCATCT GCTTTGTGGA CAACATCTTC CCTCCTGTGA
ACGACGACCC AGTCGGGTTG TGGGAGTAGA CGAAACACCT GTTGTAGAAG GGAGGACACT
N I T W L R N S K S V A D G V Y E T S F
1261 TCAACATCAC ATGGCTCAGA AATAGCAAGT CAGTCGCAGA CGGTGTTTAT GAGACCAGCT
AGTTGTAGTG TACCGAGTCT TTATCGTTCA GTCAGCGTCT GCCACAAATA CTCTGGTCGA
F V N R D Y S F H K L S Y L T F I P S D
1321 TCTTCGTCAA CCGTGACTAT TCCTTCCACA AGCTGTCTTA TCTCACCTTC ATCCCTTCTG
AGAAGCAGTT GGCACTGATA AGGAAGGTGT TCGACAGAAT AGAGTGGAAG TAGGGAAGAC
D D I Y D C K V E H W G L E E P V L K H
1381 ACGATGACAT TTATGACTGC AAGGTGGAAC ACTGGGGCCT GGAGGAGCCG GTTCTGAAAC
TGCTACTGTA AATACTGACG TTCCACCTTG TGACCCCGGA CCTCCTCGGC CAAGACTTTG
W E P E I P A P M S E L T E S G G G G
1441 ACTGGGAACC TGAGATTCCA GCCCCCATGT CAGAGCTGAC AGAGTCCGGA GGCGGAGGCG
TGACCCTTGG ACTCTAAGGT CGGGGGTACA GTCTCGACTG TCTCAGGCCT CCGCCTCCGC

FIG. 10

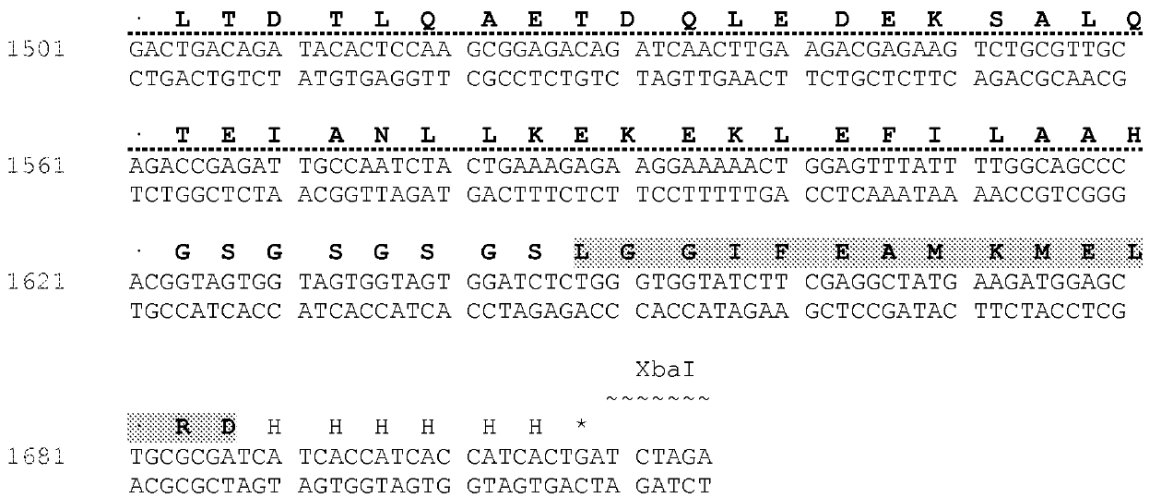


FIG. 10 (continuación)

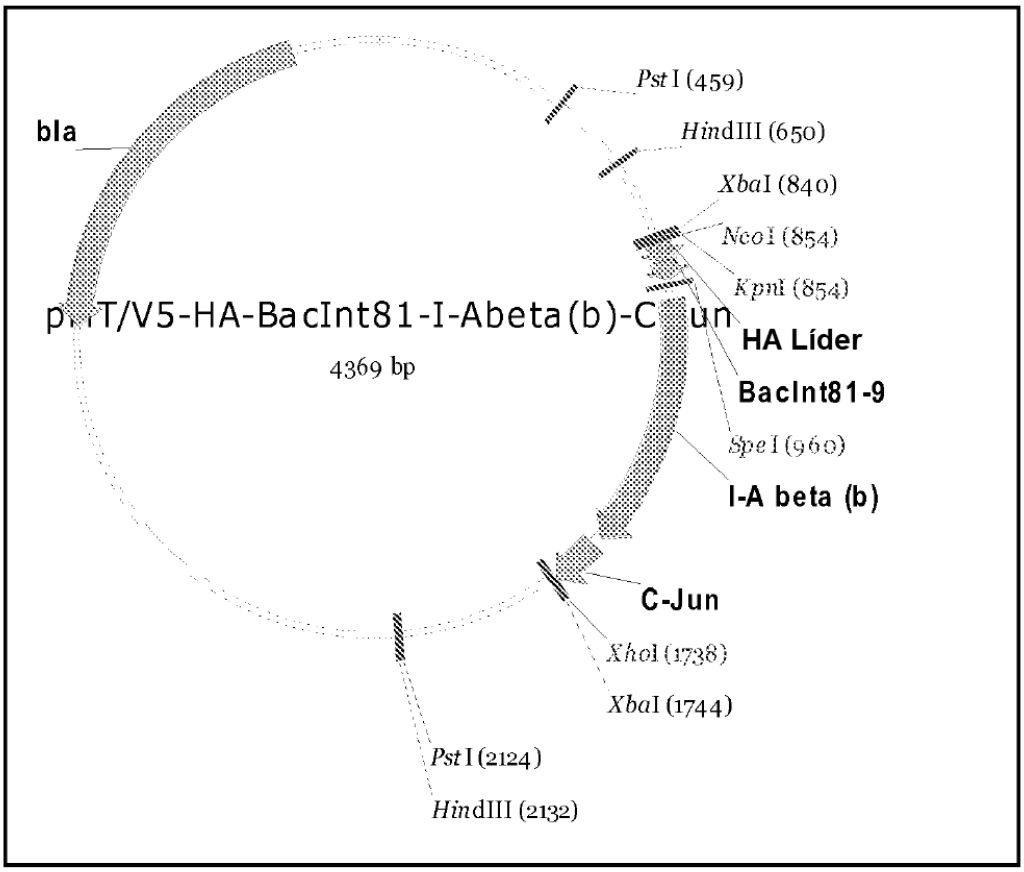

bla
PstI (459)
HindIII (650)
XbaI (840)
NcoI (854)
KpnI (854)
pcDNA3.1/V5-HA-BacInt81-I-Abeta(b)-C-Jun
4369 bp
HA Líder
BacInt81-9
SpeI (960)
I-A beta (b)
C-Jun
XhoI (1738)
XbaI (1744)
PstI (2124)
HindIII (2132)

FIG. 11

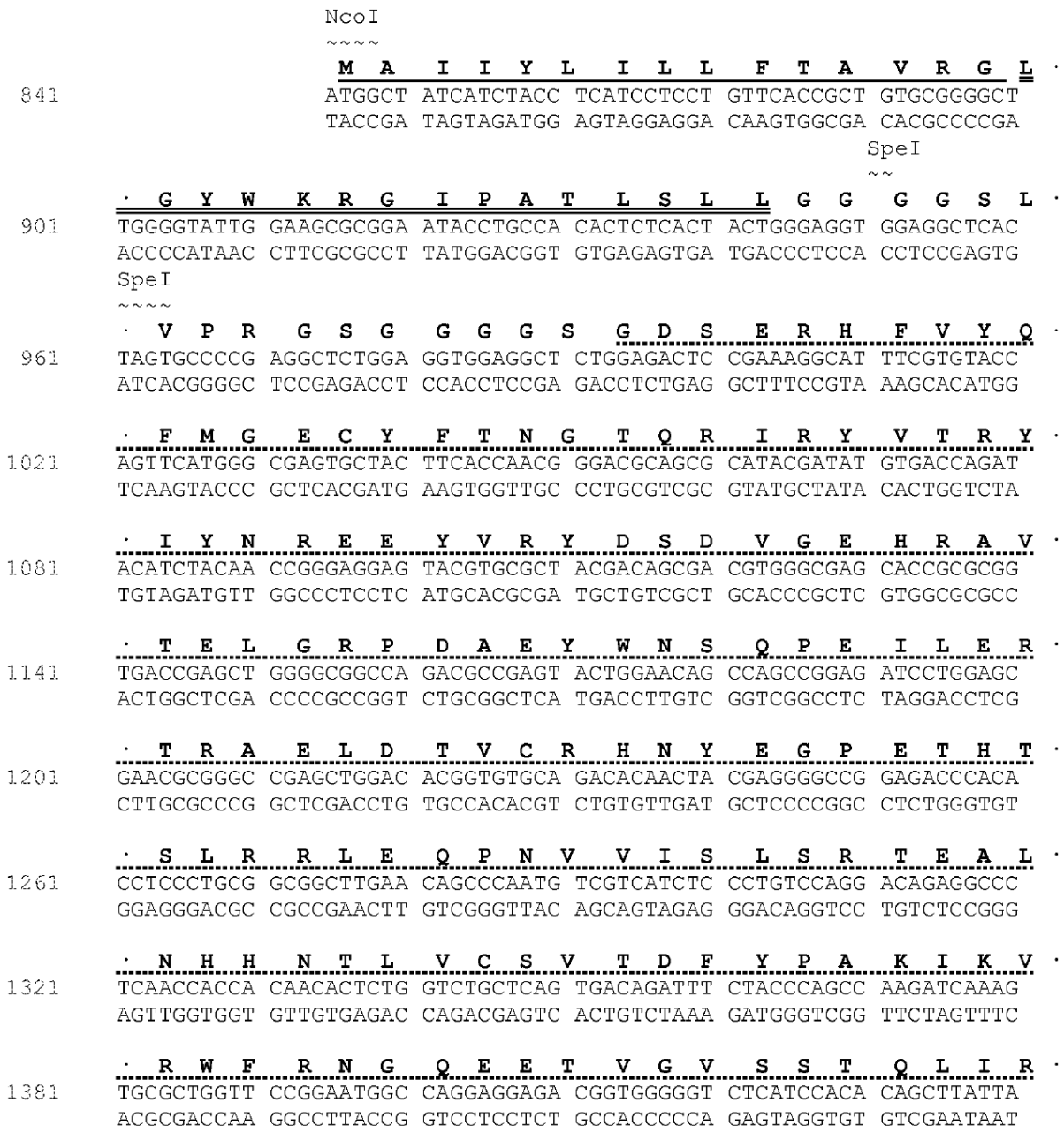

NcoI
M A I I Y L I L L F T A V R G L
841 ATGGCT ATCATCTACC TCATCCTCCT GTTCACCGCT GTGCGGGGCT
TACCGA TAGTAGATGG AGTAGGAGGA CAAGTGGCGA CACGCCCCGA
SpeI
· G Y W K R G I P A T L S L L G G G G S L ·
901 TGGGGTATTG GAAGCGCGGA ATACCTGCCA CACTCTCACT ACTGGGAGGT GGAGGCTCAC
ACCCCATAAC CTTCGCGCCT TATGGACGGT GTGAGAGTGA TGACCCTCCA CCTCCGAGTG
SpeI
· V P R G S G G G G S G D S E R H F V Y Q ·
961 TAGTGCCCCG AGGCTCTGGA GGTGGAGGCT CTGGAGACTC CGAAAGGCAT TTCGTGTACC
ATCACGGGGC TCCGAGACCT CCACCTCCGA GACCTCTGAG GCTTTCCGTA AAGCACATGG
· F M G E C Y F T N G T Q R I R Y V T R Y ·
1021 AGTTCATGGG CGAGTGCTAC TTCACCAACG GGACGCAGCG CATACGATAT GTGACCAGAT
TCAAGTACCC GCTCACGATG AAGTGGTTGC CCTGCGTCGC GTATGCTATA CACTGGTCTA
· I Y N R E E Y V R Y D S D V G E H R A V ·
1081 ACATCTACAA CCGGGAGGAG TACGTGCGCT ACGACAGCGA CGTGGGCGAG CACCGCGCGG
TGTAGATGTT GGCCCTCCTC ATGCACGCGA TGCTGTCGCT GCACCCGCTC GTGGCGCGCC
· T E L G R P D A E Y W N S Q P E I L E R ·
1141 TGACCGAGCT GGGGCGGCCA GACGCCGAGT ACTGGAACAG CCAGCCGGAG ATCCTGGAGC
ACTGGCTCGA CCCCGCCGGT CTGCGGCTCA TGACCTTGTC GGTCGGCCTC TAGGACCTCG
· T R A E L D T V C R H N Y E G P E T H T ·
1201 GAACGCGGGC CGAGCTGGAC ACGGTGTGCA GACACAACTA CGAGGGGCCG GAGACCCACA
CTTGCGCCCG GCTCGACCTG TGCCACACGT CTGTGTTGAT GCTCCCCGGC CTCTGGGTGT
· S L R R L E Q P N V V I S L S R T E A L ·
1261 CCTCCCTGCG GCGGCTTGAA CAGCCCAATG TCGTCATCTC CCTGTCCAGG ACAGAGGCCC
GGAGGGACGC CGCCGAACTT GTCGGGTTAC AGCAGTAGAG GGACAGGTCC TGTCTCCGGG
· N H H N T L V C S V T D F Y P A K I K V ·
1321 TCAACCACCA CAACACTCTG GTCTGCTCAG TGACAGATTT CTACCCAGCC AAGATCAAAG
AGTTGGTGGT GTTGTGAGAC CAGACGAGTC ACTGTCTAAA GATGGGTCGG TTCTAGTTTC
· R W F R N G Q E E T V G V S S T Q L I R ·
1381 TGCGCTGGTT CCGGAATGGC CAGGAGGAGA CGGTGGGGGT CTCATCCACA CAGCTTATTA
ACGCGACCAA GGCCTTACCG GTCCTCCTCT GCCACCCCCA GAGTAGGTGT GTCGAATAAT

FIG. 12

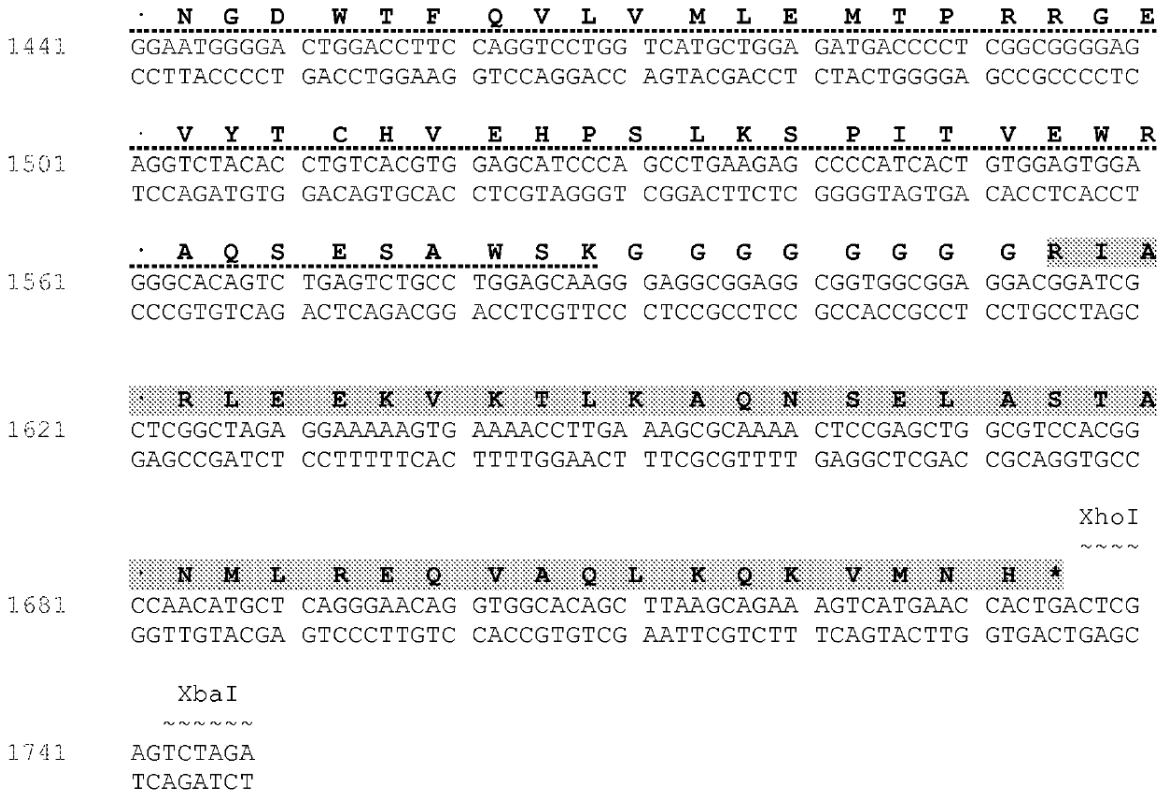


FIG. 12 (continuación)

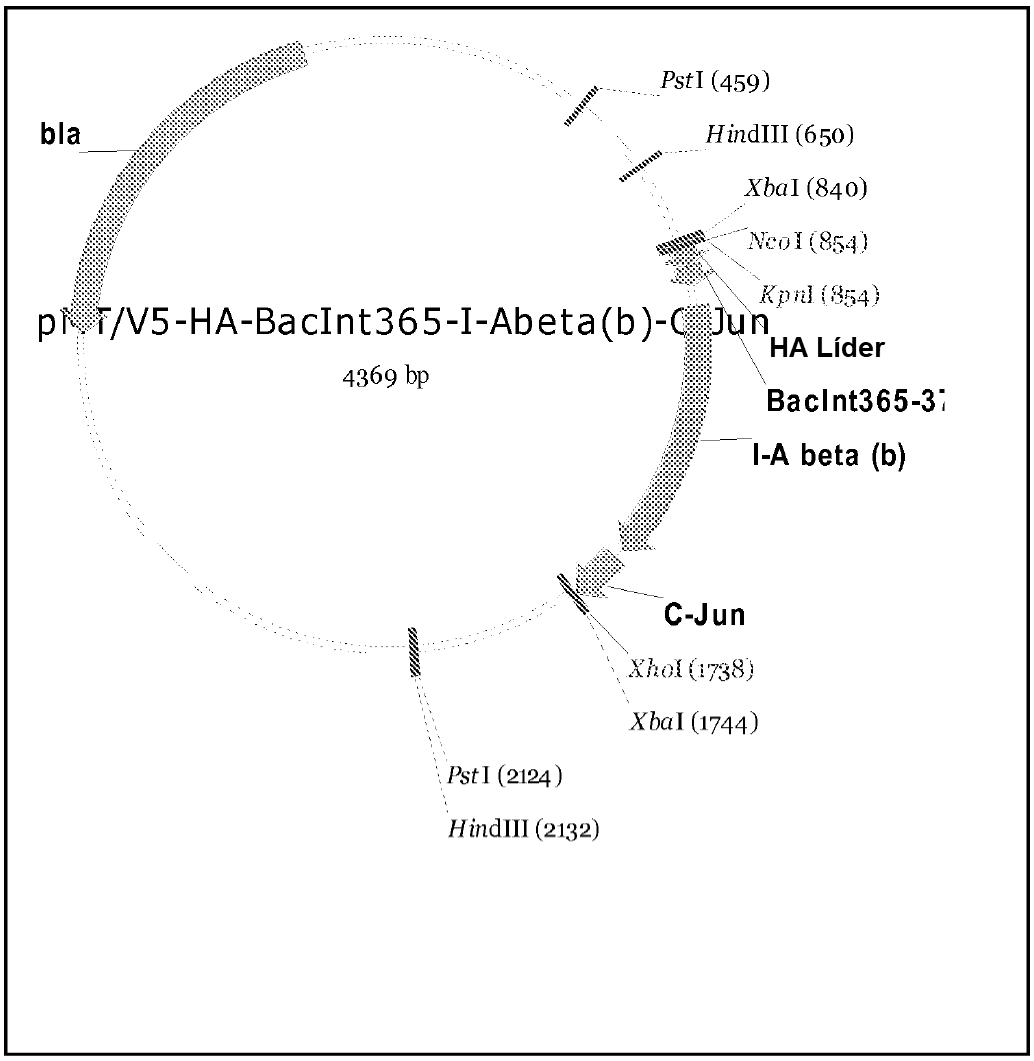

bla
PstI (459)
HindIII (650)
XbaI (840)
NcoI (854)
KpnI (854)
HA Líder
BacInt365-3
I-A beta (b)
C-Jun
XhoI (1738)
XbaI (1744)
PstI (2124)
HindIII (2132)
4369 bp

FIG. 13

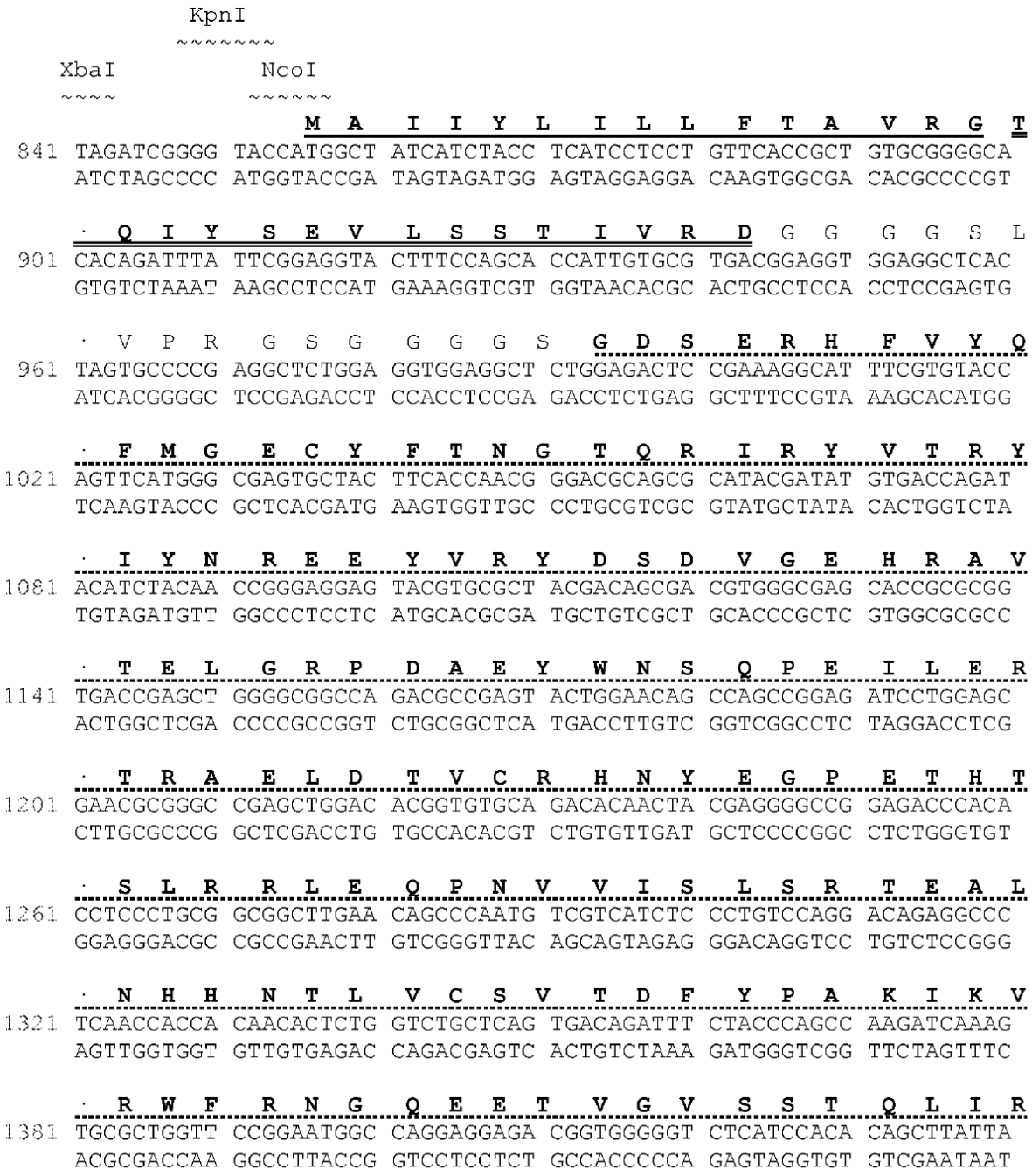

KpnI
XbaI
NcoI
M A I I Y L I L L F T A V R G T
841 TAGATCGGGG TACCATGGCT ATCATCTACC TCATCCTCCT GTTCACCGCT GTGCGGGGCA
ATCTAGCCCC ATGGTACCGA TAGTAGATGG AGTAGGAGGA CAAGTGGCGA CACGCCCCGT
Q I Y S E V L S S T I V R D G G G G S L
901 CACAGATTTA TTCGGAGGTA CTTTCCAGCA CCATTGTGCG TGACGGAGGT GGAGGCTCAC
GTGTCTAAAT AAGCCTCCAT GAAAGGTCGT GGTAACACGC ACTGCCTCCA CCTCCGAGTG
V P R G S G G G G S G D S E R H F V Y Q
961 TAGTGCCCCG AGGCTCTGGA GGTGGAGGCT CTGGAGACTC CGAAAGGCAT TTCGTGTACC
ATCACGGGGC TCCGAGACCT CCACCTCCGA GACCTCTGAG GCTTTCCGTA AAGCACATGG
F M G E C Y F T N G T Q R I R Y V T R Y
1021 AGTTCATGGG CGAGTGCTAC TTCACCAACG GGACGCAGCG CATACGATAT GTGACCAGAT
TCAAGTACCC GCTCACGATG AAGTGGTTGC CCTGCGTCGC GTATGCTATA CACTGGTCTA
I Y N R E E Y V R Y D S D V G E H R A V
1081 ACATCTACAA CCGGGAGGAG TACGTGCGCT ACGACAGCGA CGTGGGCGAG CACCGCGCGG
TGTAGATGTT GGCCCTCCTC ATGCACGCGA TGCTGTCGCT GCACCCGCTC GTGGCGCGCC
T E L G R P D A E Y W N S Q P E I L E R
1141 TGACCGAGCT GGGGCGGCCA GACGCCGAGT ACTGGAACAG CCAGCCGGAG ATCCTGGAGC
ACTGGCTCGA CCCCGCCGGT CTGCGGCTCA TGACCTTGTC GGTCGGCCTC TAGGACCTCG
T R A E L D T V C R H N Y E G P E T H T
1201 GAACGCGGGC CGAGCTGGAC ACGGTGTGCA GACACAACTA CGAGGGGCCG GAGACCCACA
CTTGCGCCCG GCTCGACCTG TGCCACACGT CTGTGTTGAT GCTCCCCGGC CTCTGGGTGT
S L R R L E Q P N V V I S L S R T E A L
1261 CCTCCCTGCG GCGGCTTGAA CAGCCCAATG TCGTCATCTC CCTGTCCAGG ACAGAGGCCC
GGAGGGACGC CGCCGAACTT GTCGGGTTAC AGCAGTAGAG GGACAGGTCC TGTCTCCGGG
N H H N T L V C S V T D F Y P A K I K V
1321 TCAACCACCA CAACACTCTG GTCTGCTCAG TGACAGATTT CTACCCAGCC AAGATCAAAG
AGTTGGTGGT GTTGTGAGAC CAGACGAGTC ACTGTCTAAA GATGGGTCGG TTCTAGTTTC
R W F R N G Q E E T V G V S S T Q L I R
1381 TGCGCTGGTT CCGGAATGGC CAGGAGGAGA CGGTGGGGGT CTCATCCACA CAGCTTATTA
ACGCGACCAA GGCCTTACCG GTCCTCCTCT GCCACCCCCA GAGTAGGTGT GTCGAATAAT

FIG. 14

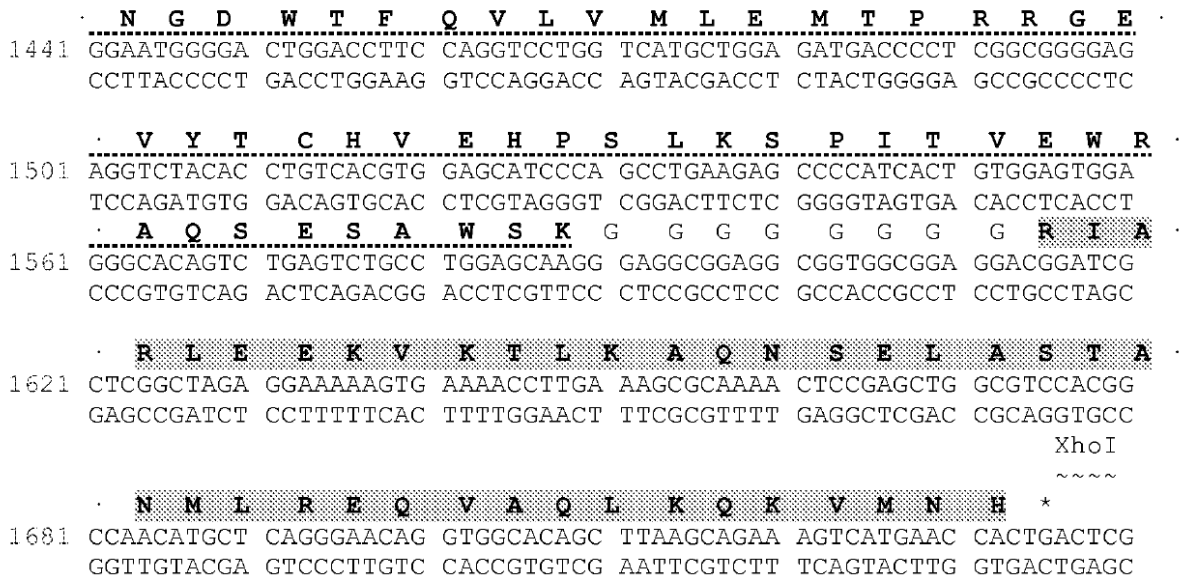


FIG. 14 (continuación)

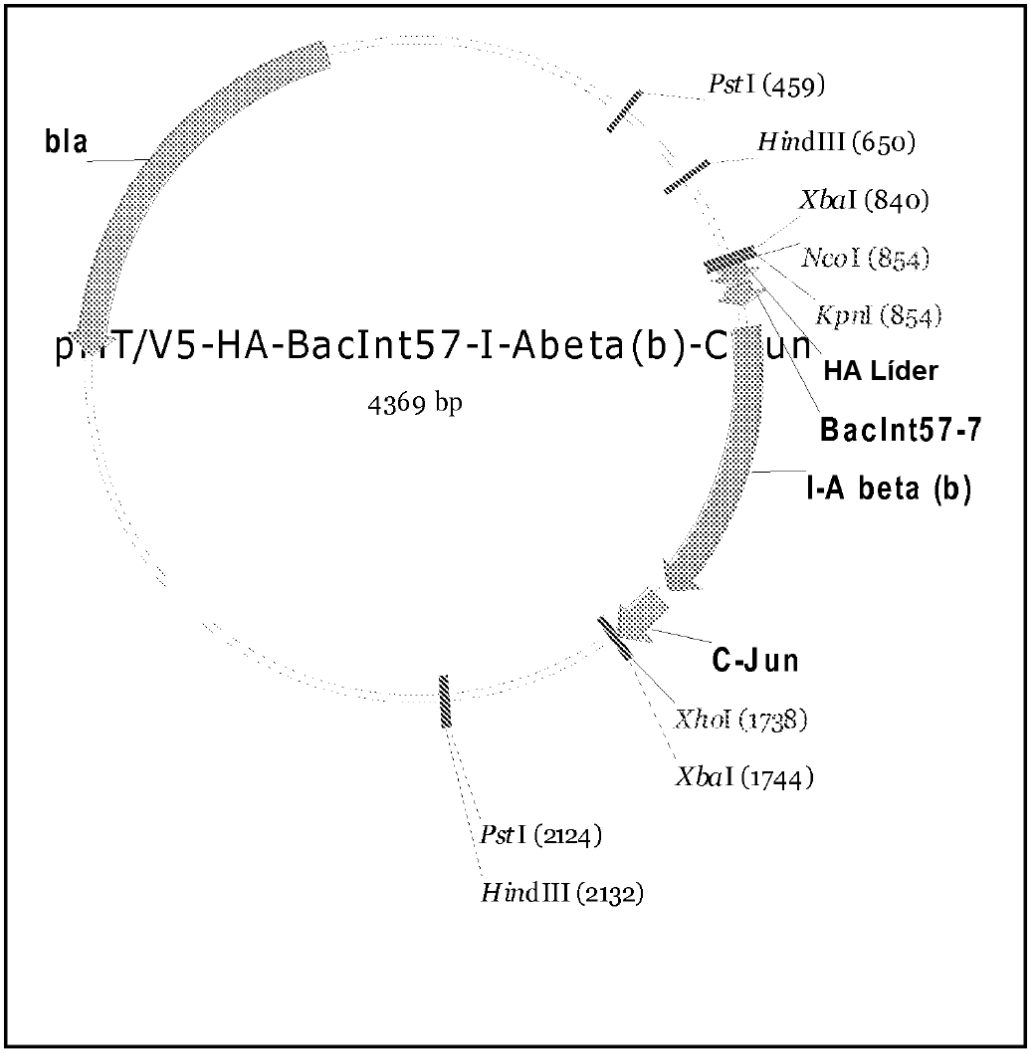

bla
PstI (459)
HindIII (650)
XbaI (840)
NcoI (854)
KpnI (854)
HA Líder
BacInt57-7
I-A beta (b)
C-Jun
XhoI (1738)
XbaI (1744)
PstI (2124)
HindIII (2132)
4369 bp

FIG. 15

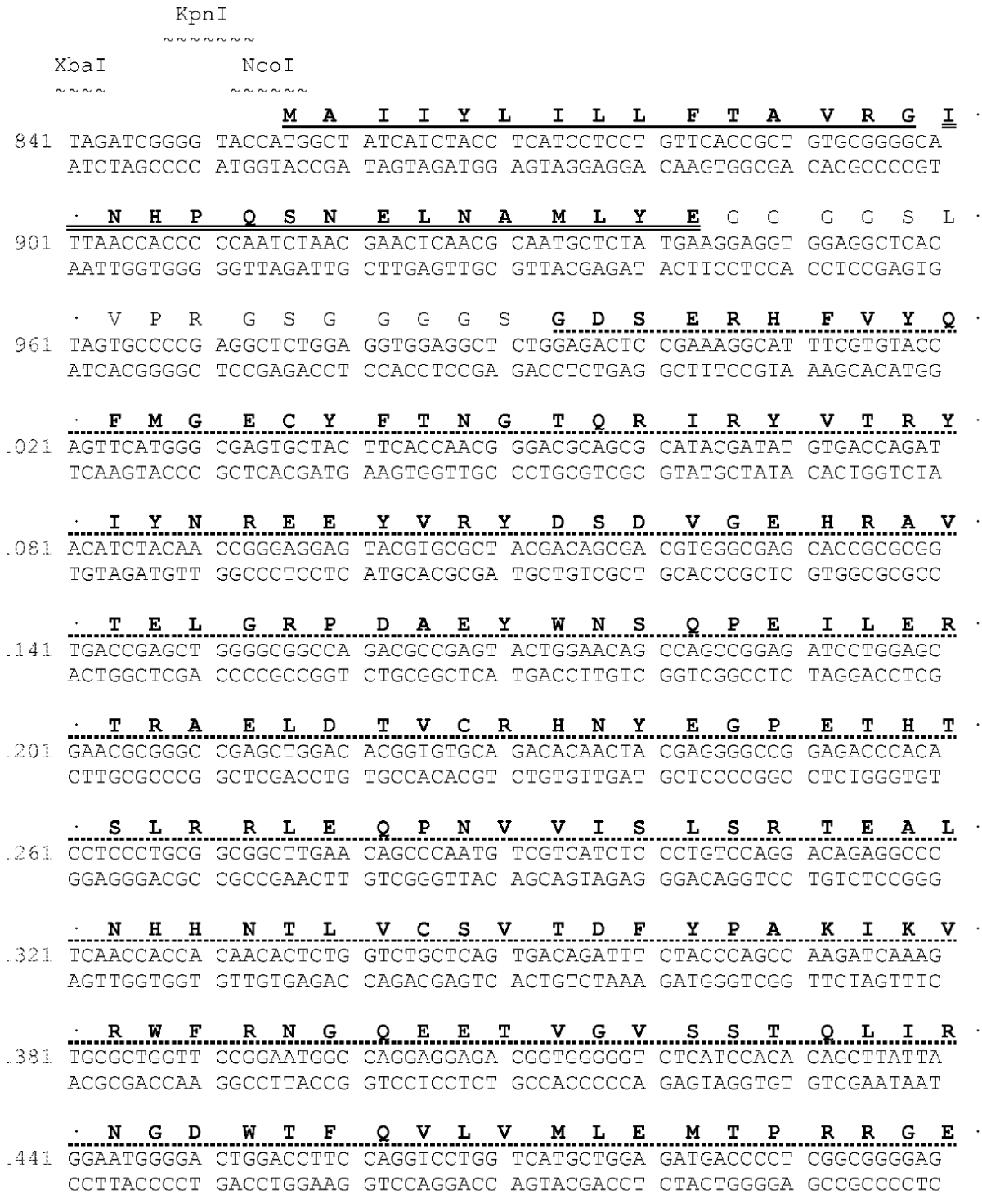

KpnI
XbaI
NcoI
M A I I Y L I L L F T A V R G I
841 TAGATCGGGG TACCATGGCT ATCATCTACC TCATCCTCCT GTTCACCGCT GTGCGGGGCA
ATCTAGCCCC ATGGTACCGA TAGTAGATGG AGTAGGAGGA CAAGTGGCGA CACGCCCCGT
N H P Q S N E L N A M L Y E G G G G S L
901 TTAACCACCC CCAATCTAAC GAACTCAACG CAATGCTCTA TGAAGGAGGT GGAGGCTCAC
AATTGGTGGG GGTTAGATTG CTTGAGTTGC GTTACGAGAT ACTTCCTCCA CCTCCGAGTG
V P R G S G G G G S G D S E R H F V Y Q
961 TAGTGCCCCG AGGCTCTGGA GGTGGAGGCT CTGGAGACTC CGAAAGGCAT TTCGTGTACC
ATCACGGGGC TCCGAGACCT CCACCTCCGA GACCTCTGAG GCTTTCCGTA AAGCACATGG
F M G E C Y F T N G T Q R I R Y V T R Y
1021 AGTTCATGGG CGAGTGCTAC TTCACCAACG GGACGCAGCG CATACGATAT GTGACCAGAT
TCAAGTACCC GCTCACGATG AAGTGGTTGC CCTGCGTCGC GTATGCTATA CACTGGTCTA
I Y N R E E Y V R Y D S D V G E H R A V
1081 ACATCTACAA CCGGGAGGAG TACGTGCGCT ACGACAGCGA CGTGGGCGAG CACCGCGCGG
TGTAGATGTT GGCCCTCCTC ATGCACGCGA TGCTGTCGCT GCACCCGCTC GTGGCGCGCC
T E L G R P D A E Y W N S Q P E I L E R
1141 TGACCGAGCT GGGGCGGCCA GACGCCGAGT ACTGGAACAG CCAGCCGGAG ATCCTGGAGC
ACTGGCTCGA CCCCGCCGGT CTGCGGCTCA TGACCTTGTC GGTCGGCCTC TAGGACCTCG
T R A E L D T V C R H N Y E G P E T H T
1201 GAACGCGGGC CGAGCTGGAC ACGGTGTGCA GACACAACTA CGAGGGGCCG GAGACCCACA
CTTGCGCCCG GCTCGACCTG TGCCACACGT CTGTGTTGAT GCTCCCCGGC CTCTGGGTGT
S L R R L E Q P N V V I S L S R T E A L
1261 CCTCCCTGCG GCGGCTTGAA CAGCCCAATG TCGTCATCTC CCTGTCCAGG ACAGAGGCCC
GGAGGGACGC CGCCGAACTT GTCGGGTTAC AGCAGTAGAG GGACAGGTCC TGTCTCCGGG
N H H N T L V C S V T D F Y P A K I K V
1321 TCAACCACCA CAACACTCTG GTCTGCTCAG TGACAGATTT CTACCCAGCC AAGATCAAAG
AGTTGGTGGT GTTGTGAGAC CAGACGAGTC ACTGTCTAAA GATGGGTCGG TTCTAGTTTC
R W F R N G Q E E T V G V S S T Q L I R
1381 TGCGCTGGTT CCGGAATGGC CAGGAGGAGA CGGTGGGGGT CTCATCCACA CAGCTTATTA
ACGCGACCAA GGCCTTACCG GTCCTCCTCT GCCACCCCCA GAGTAGGTGT GTCGAATAAT
N G D W T F Q V L V M L E M T P R R G E
1441 GGAATGGGGA CTGGACCTTC CAGGTCCTGG TCATGCTGGA GATGACCCCT CGGCGGGGAG
CCTTACCCCT GACCTGGAAG GTCCAGGACC AGTACGACCT CTACTGGGGA GCCGCCCCTC

FIG. 16

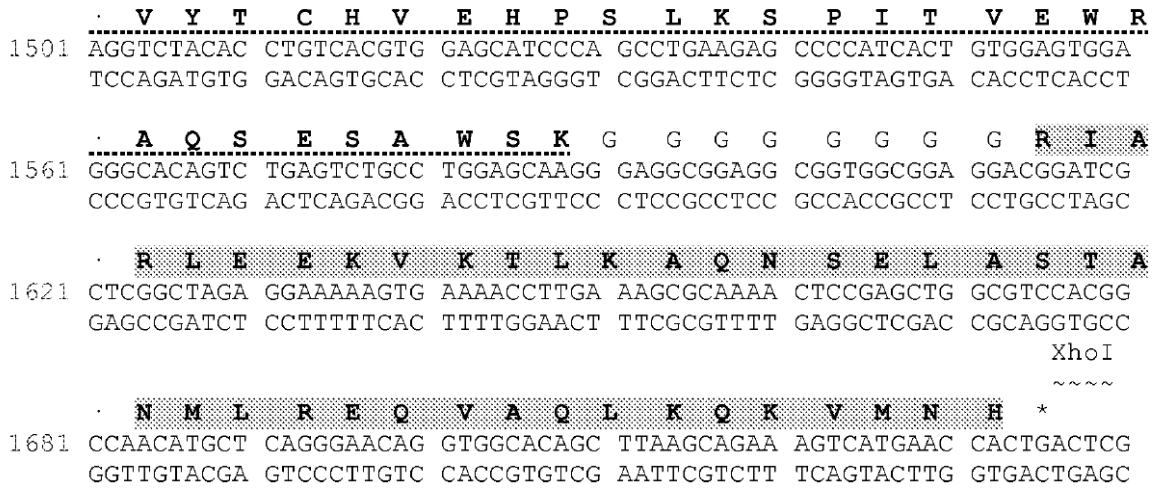


FIG. 16 (continuación)

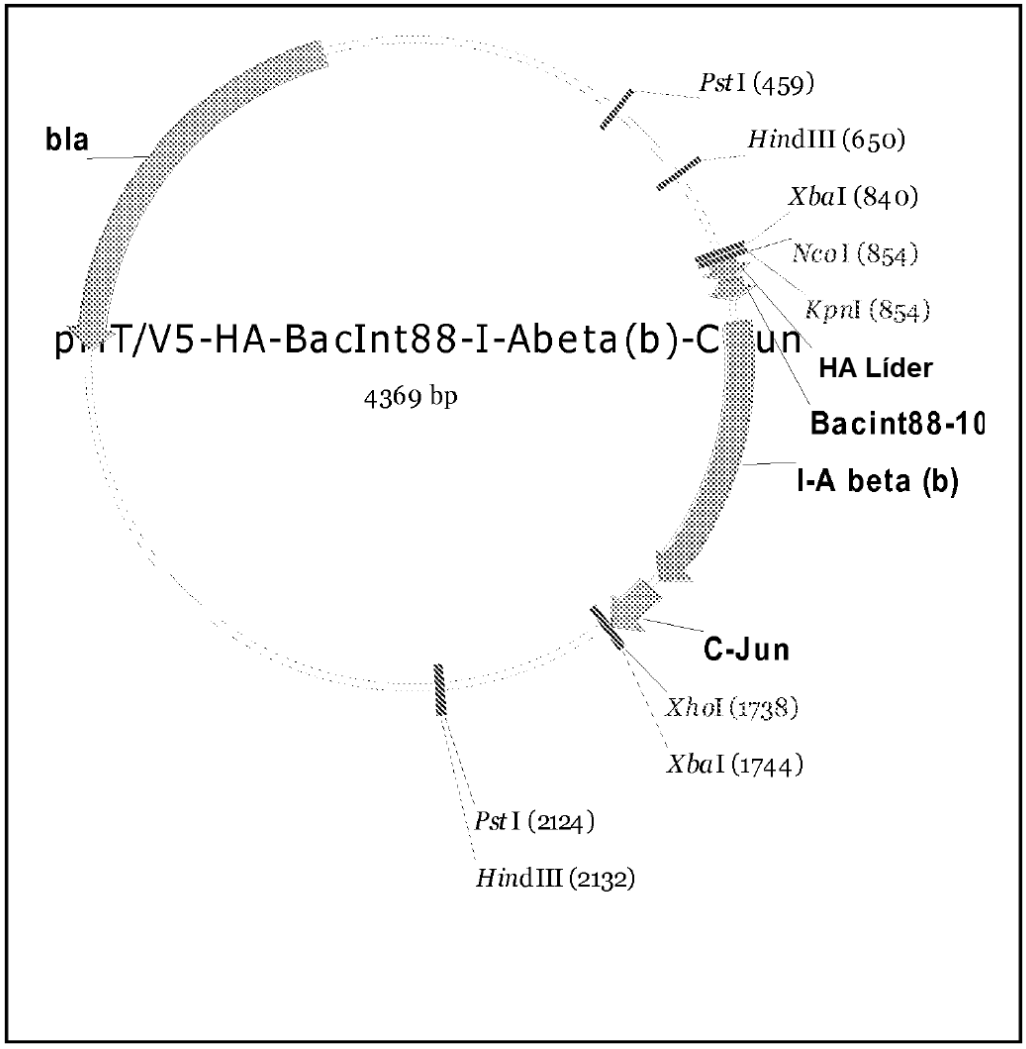

bla
PstI (459)
HindIII (650)
XbaI (840)
NcoI (854)
KpnI (854)
HA Líder
Bacint88-10
I-A beta (b)
C-Jun
XhoI (1738)
XbaI (1744)
PstI (2124)
HindIII (2132)
4369 bp

FIG. 17

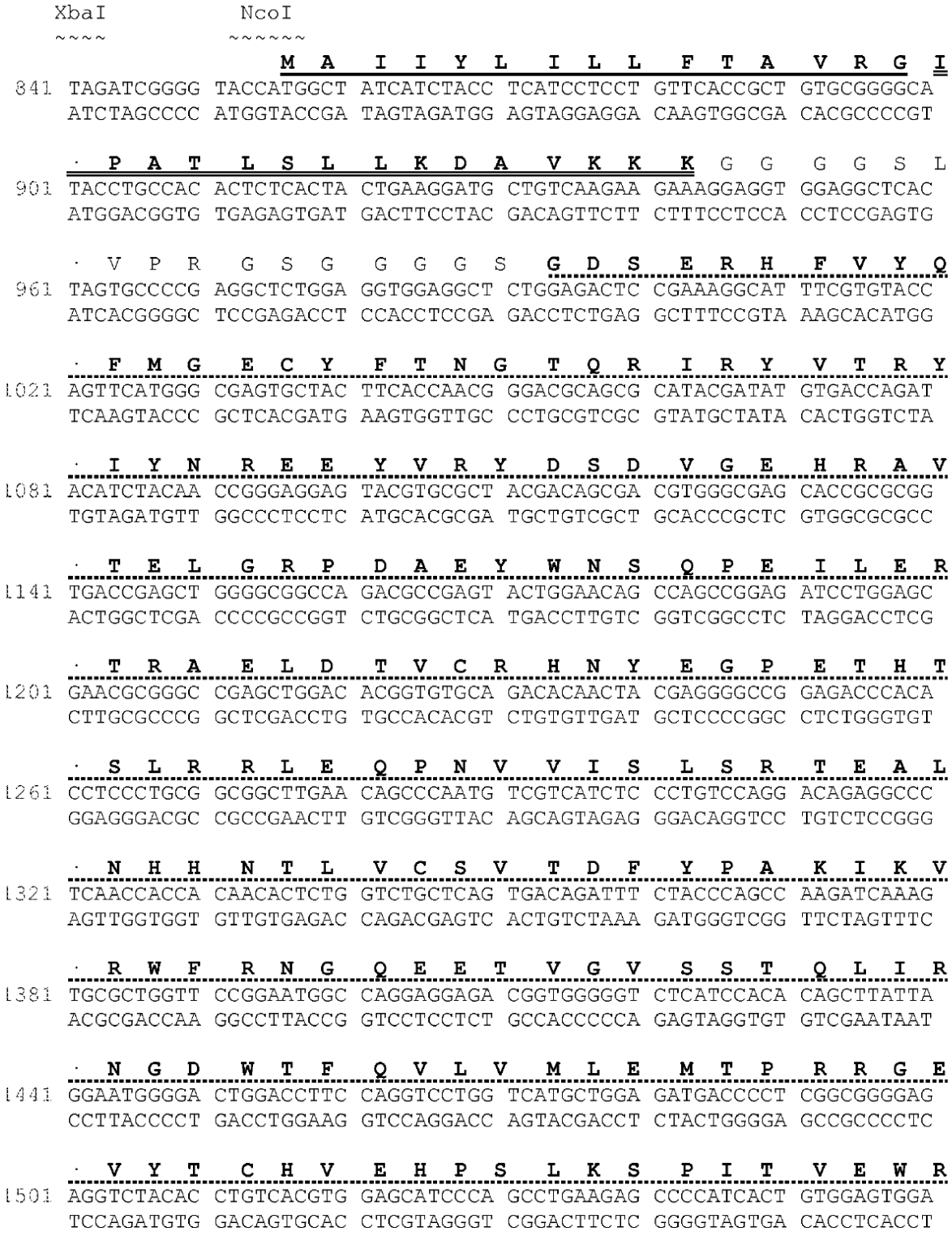

XbaI
NcoI
M A I I Y L I L L F T A V R G I
841 TAGATCGGGG TACCATGGCT ATCATCTACC TCATCCTCCT GTTCACCGCT GTGCGGGGCA
ATCTAGCCCC ATGGTACCGA TAGTAGATGG AGTAGGAGGA CAAGTGGCGA CACGCCCCGT
P A T L S L L K D A V K K K G G G G S L
901 TACCTGCCAC ACTCTCACTA CTGAAGGATG CTGTCAAGAA GAAAGGAGGT GGAGGCTCAC
ATGGACGGTG TGAGAGTGAT GACTTCCTAC GACAGTTCTT CTTTCCTCCA CCTCCGAGTG
V P R G S G G G G S G D S E R H F V Y Q
961 TAGTGCCCCG AGGCTCTGGA GGTGGAGGCT CTGGAGACTC CGAAAGGCAT TTCGTGTACC
ATCACGGGGC TCCGAGACCT CCACCTCCGA GACCTCTGAG GCTTTCCGTA AAGCACATGG
F M G E C Y F T N G T Q R I R Y V T R Y
1021 AGTTCATGGG CGAGTGCTAC TTCACCAACG GGACGCAGCG CATACGATAT GTGACCAGAT
TCAAGTACCC GCTCACGATG AAGTGGTTGC CCTGCGTCGC GTATGCTATA CACTGGTCTA
I Y N R E E Y V R Y D S D V G E H R A V
1081 ACATCTACAA CCGGGAGGAG TACGTGCGCT ACGACAGCGA CGTGGGCGAG CACCGCGCGG
TGTAGATGTT GGCCCTCCTC ATGCACGCGA TGCTGTCGCT GCACCCGCTC GTGGCGCGCC
T E L G R P D A E Y W N S Q P E I L E R
1141 TGACCGAGCT GGGGCGGCCA GACGCCGAGT ACTGGAACAG CCAGCCGGAG ATCCTGGAGC
ACTGGCTCGA CCCCGCCGGT CTGCGGCTCA TGACCTTGTC GGTCGGCCTC TAGGACCTCG
T R A E L D T V C R H N Y E G P E T H T
1201 GAACGCGGGC CGAGCTGGAC ACGGTGTGCA GACACAACTA CGAGGGGCCG GAGACCCACA
CTTGCGCCCG GCTCGACCTG TGCCACACGT CTGTGTTGAT GCTCCCCGGC CTCTGGGTGT
S L R R L E Q P N V V I S L S R T E A L
1261 CCTCCCTGCG GCGGCTTGAA CAGCCCAATG TCGTCATCTC CCTGTCCAGG ACAGAGGCCC
GGAGGGACGC CGCCGAACTT GTCGGGTTAC AGCAGTAGAG GGACAGGTCC TGTCTCCGGG
N H H N T L V C S V T D F Y P A K I K V
1321 TCAACCACCA CAACACTCTG GTCTGCTCAG TGACAGATTT CTACCCAGCC AAGATCAAAG
AGTTGGTGGT GTTGTGAGAC CAGACGAGTC ACTGTCTAAA GATGGGTCGG TTCTAGTTTC
R W F R N G Q E E T V G V S S T Q L I R
1381 TGCGCTGGTT CCGGAATGGC CAGGAGGAGA CGGTGGGGGT CTCATCCACA CAGCTTATTA
ACGCGACCAA GGCCTTACCG GTCCTCCTCT GCCACCCCCA GAGTAGGTGT GTCGAATAAT
N G D W T F Q V L V M L E M T P R R G E
1441 GGAATGGGGA CTGGACCTTC CAGGTCCTGG TCATGCTGGA GATGACCCCT CGGCGGGGAG
CCTTACCCCT GACCTGGAAG GTCCAGGACC AGTACGACCT CTACTGGGGA GCCGCCCCTC
V Y T C H V E H P S L K S P I T V E W R
1501 AGGTCTACAC CTGTCACGTG GAGCATCCCA GCCTGAAGAG CCCCATCACT GTGGAGTGGA
TCCAGATGTG GACAGTGCAC CTCGTAGGGT CGGACTTCTC GGGGTAGTGA CACCTCACCT

FIG. 18

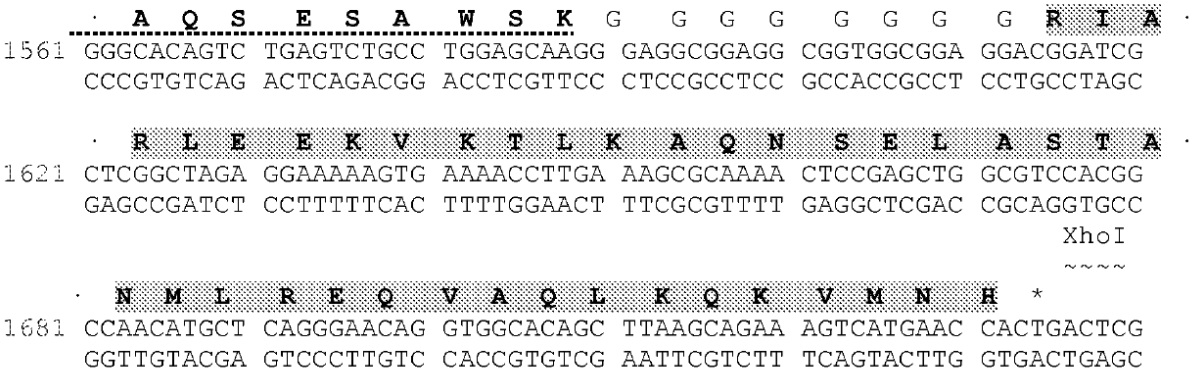


FIG. 18 (continuación)

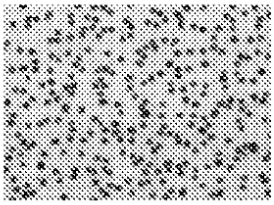


FIG. 19

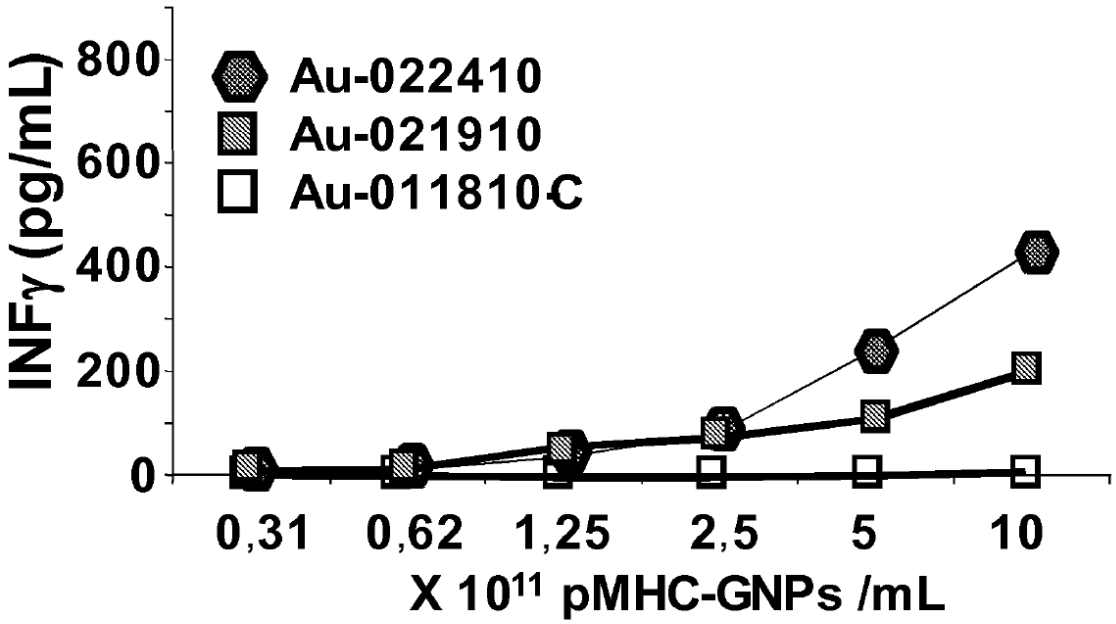

INFγ (pg/mL)
800
600
400
200
0
Au-022410
Au-021910
Au-011810-C
0,31
0,62
1,25
2,5
5
10
X 10^11 pMHC-GNPs /mL

FIG. 20

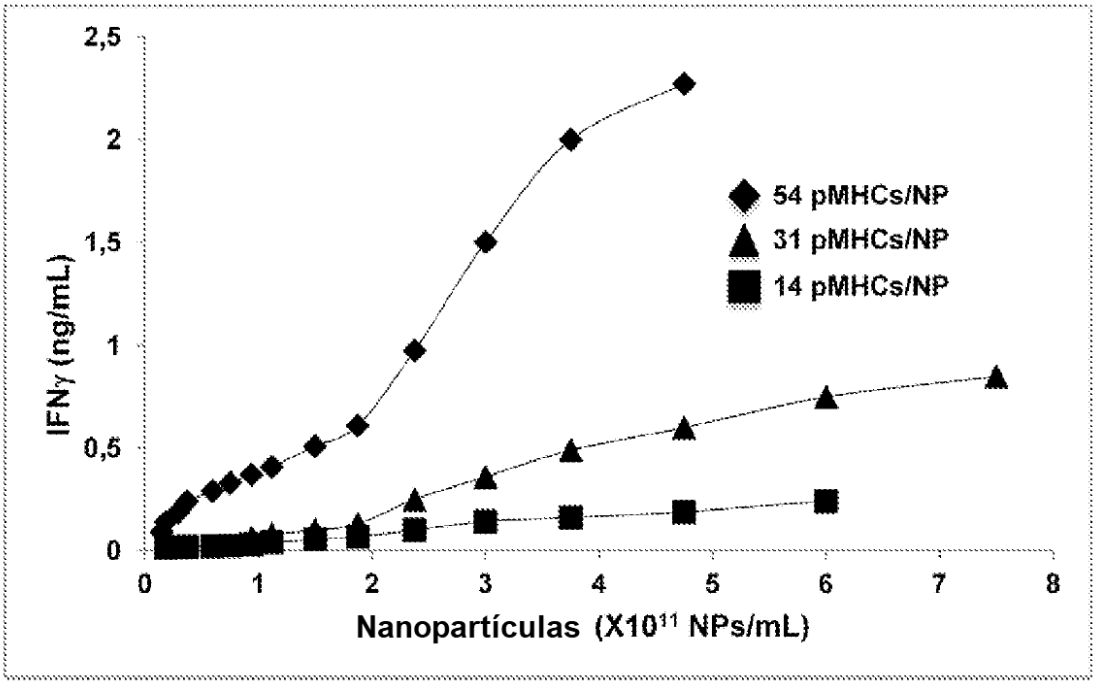

2,5
2
1,5
1
0,5
0
IFNγ (ng/mL)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Nanopartículas (X10^11 NPs/mL)
54 pMHCs/NP
31 pMHCs/NP
14 pMHCs/NP

FIG. 21

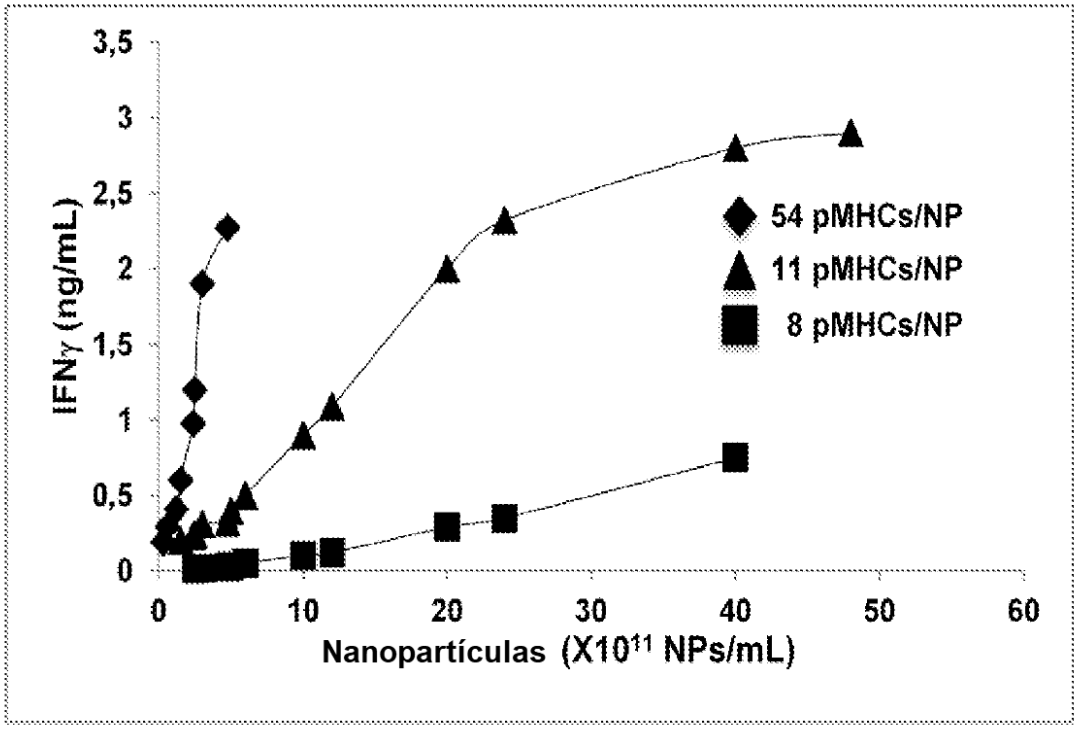

3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
IFNγ (ng/mL)
0
10
20
30
40
50
60
Nanopartículas (X10^11 NPs/mL)
54 pMHCs/NP
11 pMHCs/NP
8 pMHCs/NP

FIG. 22

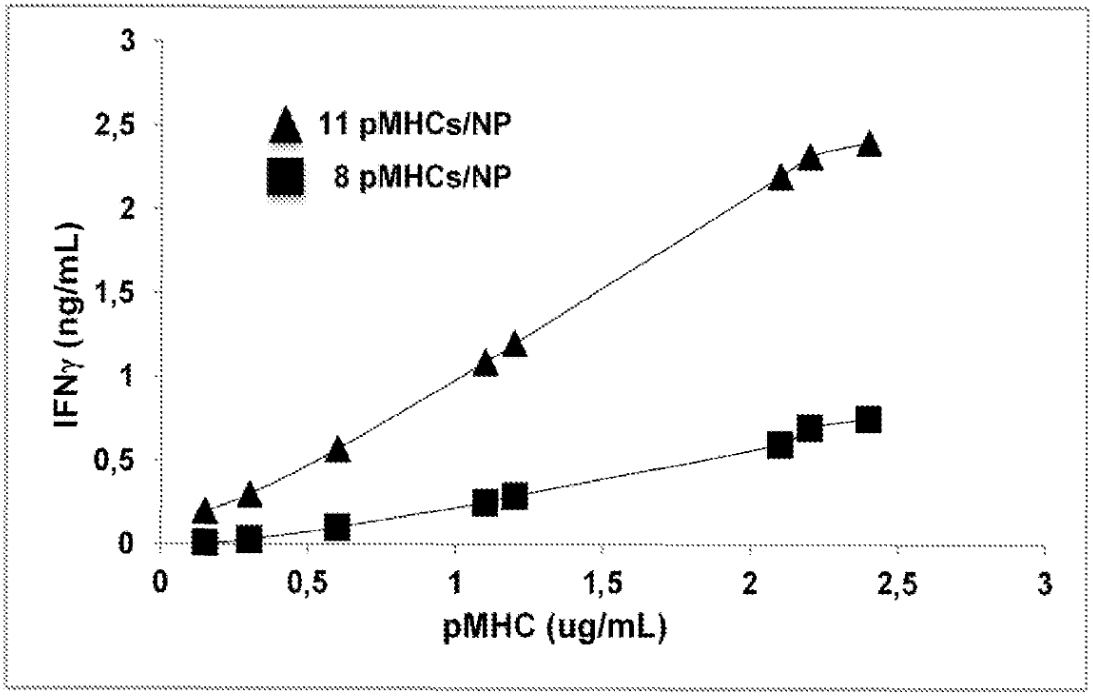

11 pMHCs/NP
8 pMHCs/NP
IFNγ (ng/mL)
pMHC (ug/mL)
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3

FIG. 23

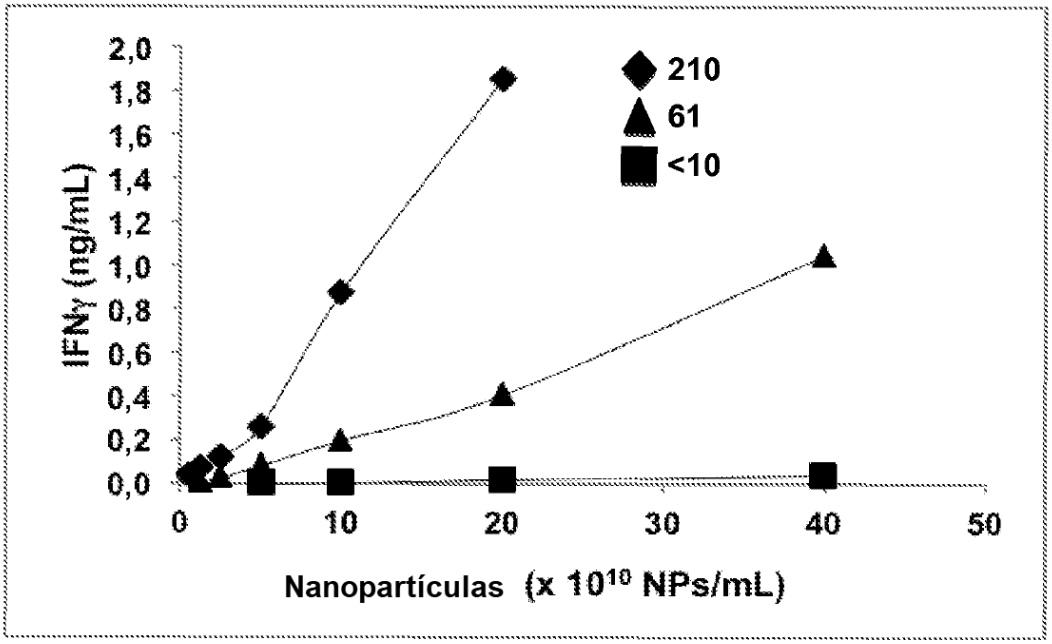

210
61
<10
IFNγ (ng/mL)
Nanopartículas (x 10¹⁰ NPs/mL)
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1,2
1,4
1,6
1,8
2,0
0
10
20
30
40
50

FIG. 24

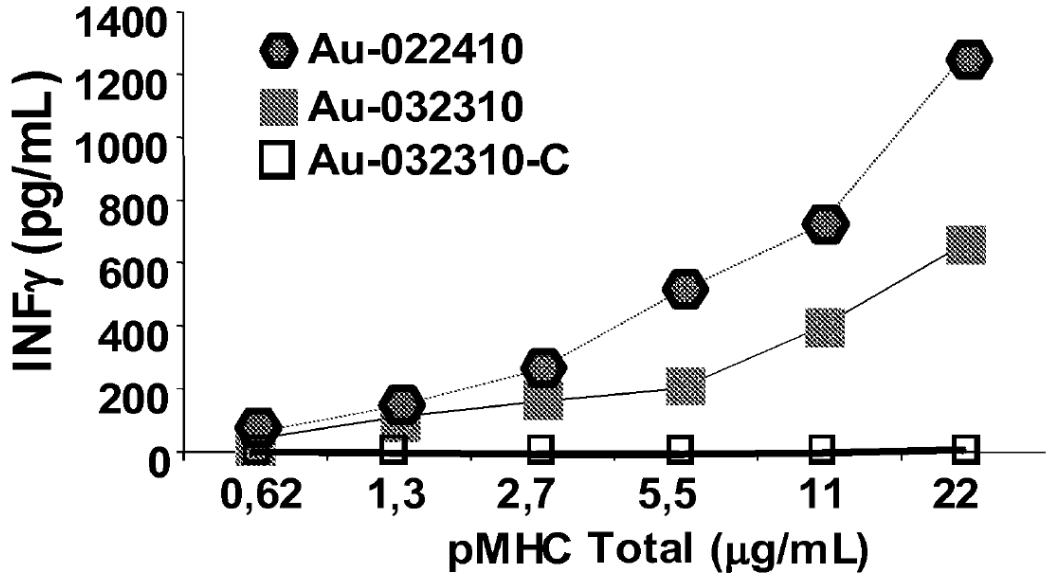

1400
1200
1000
800
600
400
200
0
INFγ (pg/mL)
Au-022410
Au-032310
Au-032310-C
0,62
1,3
2,7
5,5
11
22
pMHC Total (µg/mL)

FIG. 25

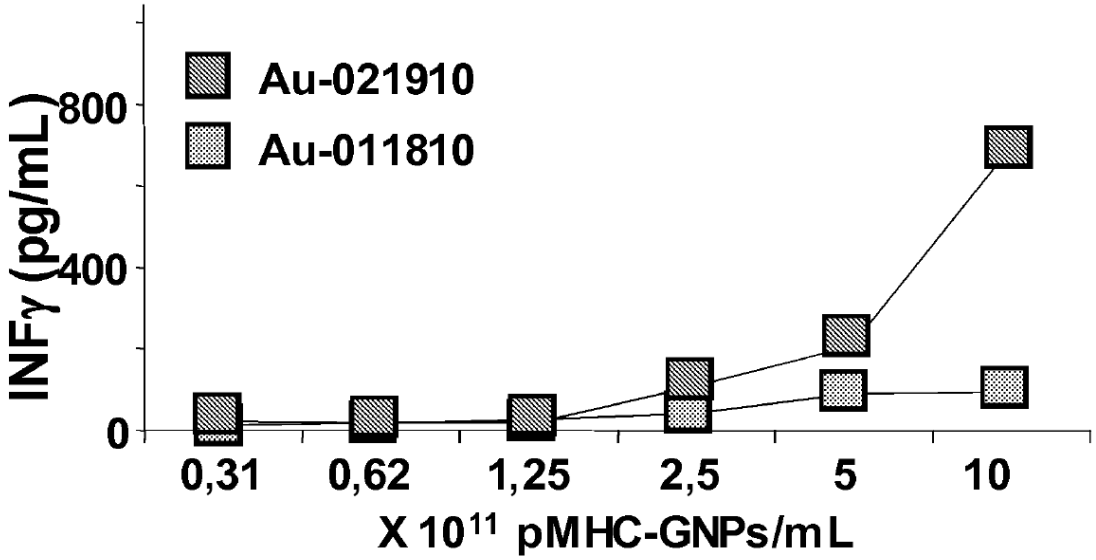

800
400
0
INFγ (pg/mL)
Au-021910
Au-011810
0,31
0,62
1,25
2,5
5
10
X 10^11 pMHC-GNPs/mL

FIG. 26

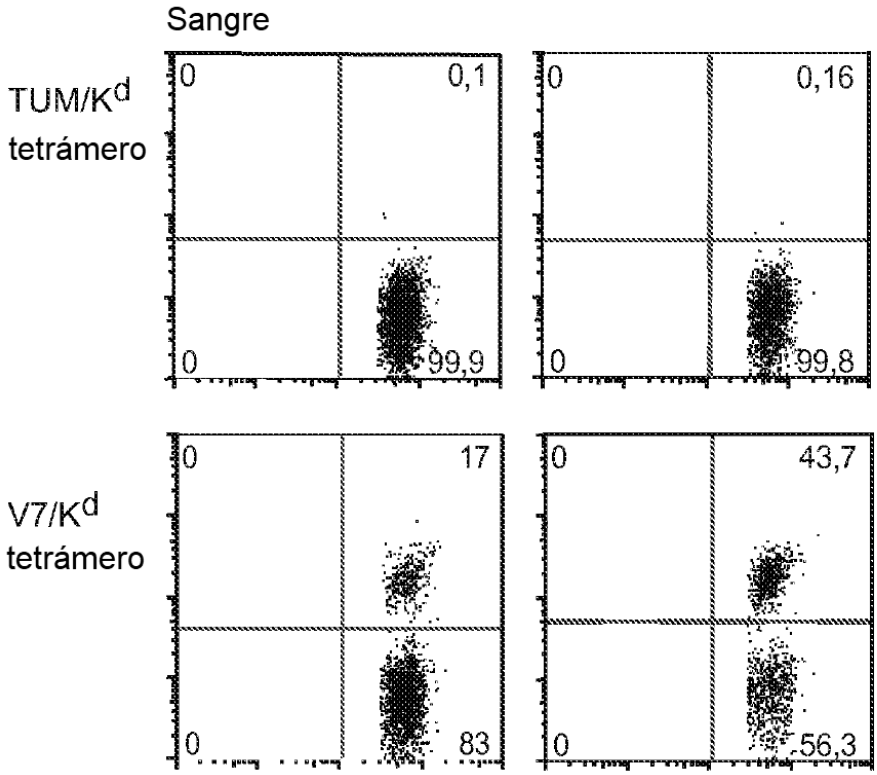

Sangre
TUM/K^d tetrámero
V7/K^d tetrámero
0
0,1
99,9
0
0,16
99,8
0
17
83
0
43,7
56,3

FIG. 27

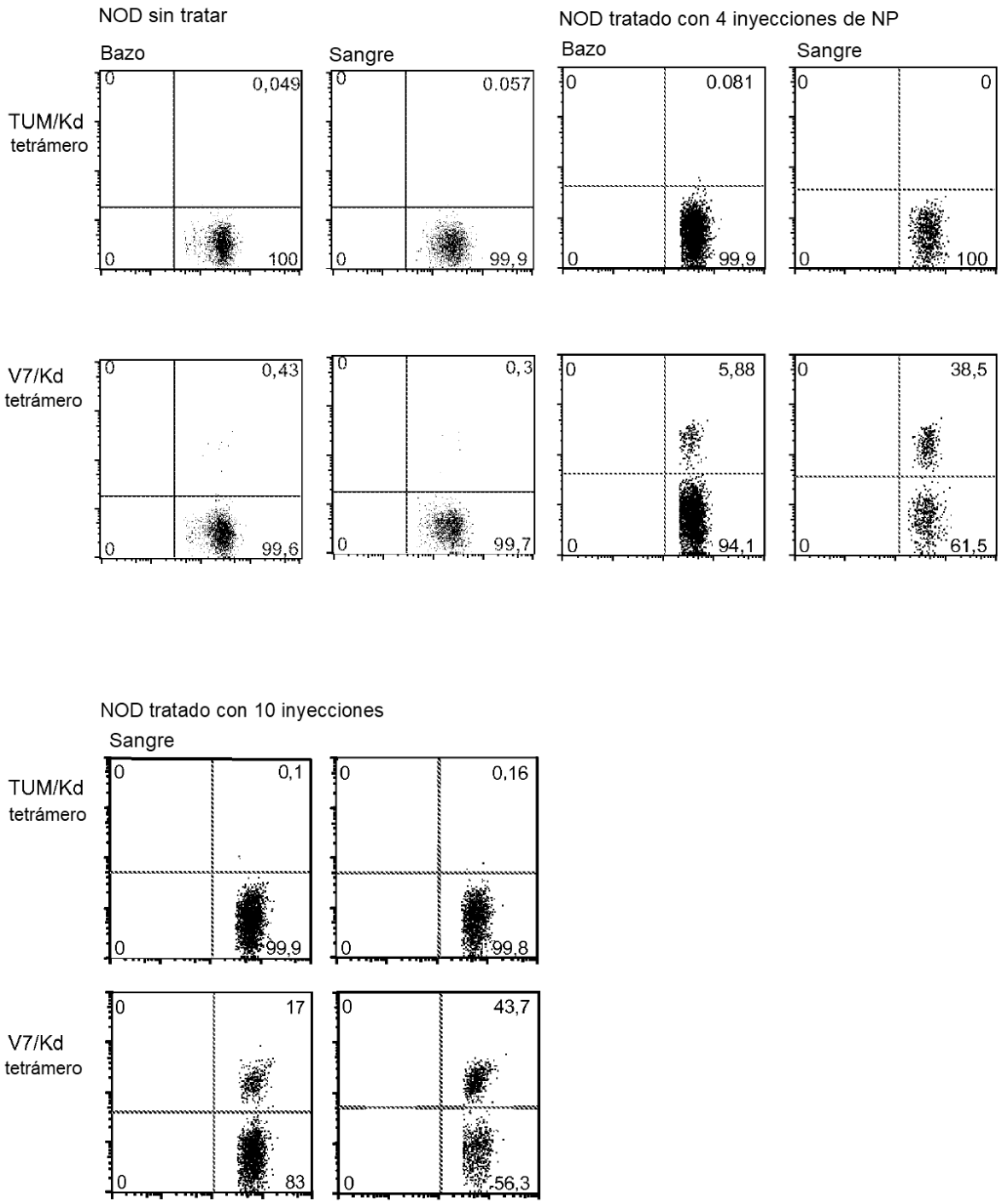

NOD sin tratar
Bazo
Sangre
NOD tratado con 4 inyecciones de NP
Bazo
Sangre
TUM/Kd tetrámero
0,049
100
0.057
99,9
0.081
99,9
0
100
V7/Kd tetrámero
0,43
99,6
0,3
99,7
5,88
94,1
38,5
61,5
NOD tratado con 10 inyecciones
Sangre
TUM/Kd tetrámero
0,1
99,9
0,16
99,8
V7/Kd tetrámero
17
83
43,7
56,3

FIG. 28