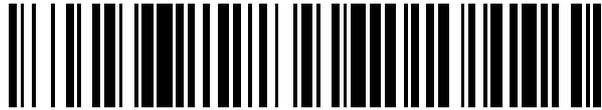


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 559**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 9/16</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/02</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/00</b>	(2006.01)
<b>C01B 25/32</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/51</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/38</b>	(2006.01)
<b>C01B 25/16</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2014 PCT/GB2014/053291**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015 WO15067939**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2014 E 14799845 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 3065715**

54 Título: **Composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo, y sus usos**

30 Prioridad:

**05.11.2013 GB 201319548**

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

**20.05.2020**

73 Titular/es:

**UNITED KINGDOM RESEARCH AND INNOVATION (100.0%)  
Polaris House, North Star Avenue  
Swindon SN2 1FL, GB**

72 Inventor/es:

**POWELL, JONATHAN JOSEPH;  
FARIA, NUNO JORGE RODRIGUES;  
PELE, LAETITIA;  
HEWITT, RACHEL y  
THOMAS-MCKAY, EMMA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 761 559 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo, y sus usos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo, y a sus usos médicos, y más particularmente a las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo para el uso en la distribución de materiales de carga, tales como moléculas de carga o nanopartículas de carga contenidas en poros del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo, a las células del sistema inmunitario. En aspectos adicionales, la presente invención se refiere a composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio para el uso en diagnóstico.

15 **Antecedentes de la invención**

El fosfato de calcio es el nombre dado a una familia de minerales que contienen iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), junto con los ortofosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), metafosfatos o pirofosfatos ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ) e iones hidrógeno o hidroxilo. Una de las formas de origen natural del fosfato de calcio presente en los huesos y en el esmalte de los dientes es la hidroxiapatita biológica (HA) la cual tiene la fórmula aproximada  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ , usualmente escrita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . En el campo biológico, la hidroxiapatita cristalina sintética es utilizada en ingeniería de tejidos, principalmente como un material de relleno para la reparación de huesos y dientes. Las nanopartículas de hidroxiapatita han sido también propuestas como portadores para fármacos y han sido empleadas en técnicas de formación de imágenes.

La hidroxiapatita puede ser preparada en una reacción de precipitación del calcio y las sales de fosfato dibásicas en solución neutra o básica, y tiene su producto final la hidroxiapatita cristalina.

Sin embargo, durante la precipitación, una fase precursora estructural y químicamente distinta es formada, la cual es amorfa a la difracción por rayos-X, conocido como fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo (ACP por sus siglas en inglés)

El análisis químico de la fase precursora indica que esta fase no cristalina es un fosfato de calcio hidratado. Como con otros materiales amorfos, han sido propuestas varias fórmulas para ACP, tales como  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ .

Las hidroxiapatitas han sido utilizadas como portadores para biomoléculas, en particular para la transfección del ADN, la distribución de fármacos, y en ortopedia y odontología. A manera de ejemplo, Chowdhury et al han investigado la distribución del ADN a las células de mamífero en cultivo mediante la precipitación del ADN con fosfato de calcio en la forma de hidroxiapatita cristalina (ver Gene, 341; 77-82, 2004; J. Controlled Release, 116(2); e68-e69, 2006; Analytical Biochemistry, 328; 96-97, 2004; US 2007/0077306). Estos experimentos incluyeron el uso de  $\text{Mg}^{2+}$  como un agente para inhibir el crecimiento de partículas de hidroxiapatita precipitada y el ADN, para evitar una pérdida de eficiencia de transfección asociada a un incremento en tamaño de partícula. Sin embargo, mientras que el  $\text{Mg}^{2+}$  fue incorporado dentro de las partículas de hidroxiapatita precipitadas con ADN, las partículas permanecieron cristalinas. Dasgupta et al. reportaron el uso de las nanopartículas de hidroxiapatita impurificadas con Zn y Mg como portadores de liberación controlada para la albúmina sérica bovina (Langmuir, 26(7); 4958-4964, 2010). Sin embargo, como con los estudios reportados por Chowdhury et al., los materiales de hidroxiapatita impurificados producidos, conservaron un grado patente de cristalinidad en común con la hidroxiapatita no modificada.

Durante la síntesis, ACP se convierte rápidamente (en presencia de agua) a hidroxiapatita microcristalina, y el lapso de vida del ACP metaestable en solución acuosa se ha reportado que es una función de la presencia de ciertas macromoléculas e iones de interferencia, el pH, la viscosidad, la fuerza iónica y la temperatura. Boskey & Posner (1973, 1974) estudiaron la cinética de la conversión y encontraron que la sustitución de los iones Ca en ACP por iones Mg conduce a mayor estabilidad del estado amorfo, disminuyendo su tendencia a convertirse a formas más cristalinas tales como la hidroxiapatita. Ellos mostraron que a una proporción de al menos 1:25 (Mg: Ca), es producida una fase de fosfato de calcio con magnesio amorfo que, como un polvo seco, permanece estable con el tiempo.

Mientras que la síntesis del ACP ha sido reportada, únicamente han sido propuestas aplicaciones muy limitadas de este material en los campos de la odontología y la ingeniería de tejidos, como material estructural para el uso en la reparación de huesos y dientes y como un andamiaje para la ingeniería de tejidos. A manera de ejemplo, Zhao et al. (Chemistry Central Journal, 5; 40-47, 2011) describen el uso del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo en odontología como un compuesto para la remineralización y la reparación de dientes. Ellos reportan que en presencia de otros iones y bajo condiciones *in vivo*, ACP puede persistir por períodos apreciables debido a la estabilización cinética en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{F}^-$ , carbonato, pirofosfato, difosfonatos o metabolitos o nucleótidos polifosforilados, previniendo la transformación del ACP sintético en hidroxiapatita. Li & Weng (J. Mater. Sci.; Mater. Med., 18; 2303-2308, 2007) reportaron la síntesis de los fosfatos de calcio amorfos (ACP) y estaban utilizando el poli(etilenglicol) como aditivo estabilizador a baja temperatura. Ellos encontraron que ACP pudo ser estabilizado por el poli(etilenglicol) en la solución madre por más de 18 horas a 5°C con 4 % en peso de poli(etilenglicol) en polvos de ACP y sugirieron que ACP puede ser utilizado como un andamiaje biodegradable para la ingeniería de tejidos.

Las placas de Peyer son folículos linfoides que llevan a cabo funciones de detección y supervisión inmunitaria crítica en el tracto gastrointestinal. La región de abajo del epitelio de las placas de Peyer es denominada como el domo subepitelial (SED por sus siglas en inglés) y está enriquecido con células presentadoras de antígeno. Las bacterias enteras y micropartículas de tamaño similar de la luz intestinal pueden ser directamente fagocitados por las células dendríticas de SED especializadas, las cuales migran hacia arriba y extienden las dendritas a través del epitelio asociado al folículo. Para la supervisión de las moléculas solubles y partículas más pequeñas, el epitelio contiene células de micropliegue (M) distintivas que parecen muestrear la luz intestinal directamente y transportar el material muestreado a las células inmunitarias subyacentes. No se sabe cómo ocurre esto exactamente y cómo el antígeno, por ejemplo, no es degradado en la ruta.

Tampoco es claro por qué las células M de las placas de Peyer muestrean ávidamente las nanopartículas no biológicas de aproximadamente 20-250 nm de diámetro de la luz intestinal. No obstante que esto ocurra, esto es bien demostrado en los modelos celulares y animales y también para humanos con exposición normal día con día a las nanopartículas provenientes de alimentos procesados, productos farmacéuticos y pasta dental.

### Breve descripción de la invención

En líneas generales, la presente invención está basada en la introspectiva de los presentes inventores a partir de los experimentos descritos en la presente de que la partícula no biológica más abundante de la luz gastrointestinal de mamíferos es el fosfato de calcio, en la forma de nanopartículas de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo. Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  son activamente secretados hacia la luz intestinal distal, donde el fosfato de calcio se sobresatura y de este modo se precipita. La secreción del calcio por el intestino es frecuentemente denominada como pérdidas endógenas, pero no se sabe por qué debe ocurrir esto, ya que contribuye poco a la homeostasis del calcio, la excreción del cual es mediada a través de la orina. La presente invención está además basada en los hallazgos de los presentes inventores que en el tracto gastrointestinal, los iones calcio y los iones fosfato se precipitan y forman nanopartículas y micropartículas pequeñas que atrapan las moléculas orgánicas presentes en la luz para la distribución a las células inmunitarias mucosales del intestino en las placas de Peyer, y a los nódulos linfáticos mesentéricos. Sin desear estar comprometidos por alguna teoría particular, los presentes inventores creen que esto contribuye a la inmunosupervisión del intestino, de los antígenos y otras moléculas que están en el ambiente local, proporcionando un mecanismo mediante el cual los antígenos y otras moléculas son presentadas a u observadas por el sistema inmunitario. Los estudios descritos en la presente demuestran que esto ocurre de manera natural para el peptidoglicano bacteriano en experimentos en los cuales fueron utilizadas secciones de tejidos intestinales murinos y humanos, para detectar la presencia de las nanopartículas de fosfato calcio y la presencia del peptidoglicano, conjuntamente, en células inmunitarias especializadas del intestino. Esto también es confirmado al mostrar en ratones que el antígeno proteico oralmente alimentado, específicamente la albumina, sigue esta vía.

Mientras que se ha propuesto en general que las micropartículas, es decir de tamaño de diámetro micrométrico o al menos de un tamaño de microbio típico, el fosfato de calcio puede formar y tener la función en el tracto intestinal, la presente invención se refiere a las partículas amorfas más pequeñas. Los presentes inventores han mostrado además que las nanopartículas de fosfato de calcio producidas endógenamente, comprenden una fase de fosfato de calcio amorfo normalmente de 75 nm a 150 nm de diámetro, aunque tan pequeñas como de 5 nm y tan grandes como de 250 nm, y que tienen una porosidad extensa mediante microscopia electrónica. La porosidad es normalmente de 1-2 nm de diámetro y se propone que es en parte o totalmente debido a la incorporación de moléculas orgánicas que no pueden ser formadas en imagen por el microscopio electrónico.

Los presentes inventores se dieron cuenta que la absorción de nanopartículas pequeñas endógenas por las células inmunitarias en el tracto gastrointestinal, significa que los miméticos sintéticos de las nanopartículas endógenas pueden ser desarrollados, los cuales son capaces de transportar el material de carga, tales como moléculas de carga o nanopartículas, para la absorción por las células de una manera análoga a las nanopartículas endógenamente producidas. En consecuencia, en un aspecto, la presente invención se refiere a los miméticos sintéticos de las nanopartículas de fosfato de calcio amorfo endógenas, pequeñas, y sus usos, en particular para atrapar y distribuir materiales de carga biológicamente activos, tales como moléculas de carga y/o nanopartículas, para el uso en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. En consecuencia, en este aspecto, la presente invención proporciona una composición para el uso en un método de administrar un material de carga biológicamente activo al tracto gastrointestinal, en donde la composición comprende fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo (AMCP), que atrapa un material de carga biológicamente activo, de esta manera permitiendo que el material de carga se distribuya a un sitio de interés en el tracto gastrointestinal.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición para el uso en un método de tratamiento o de prevención de una enfermedad mediante la distribución de un material de carga biológicamente activo al tracto gastrointestinal en donde la composición comprende fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo (AMCP) el cual atrapa el material de carga biológicamente activo, con lo cual hace posible que el material de carga sea distribuido a un sitio de interés en el tracto gastrointestinal.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición para el uso en un método *in vivo* de diagnóstico o formación de imágenes, en donde la composición comprende el fosfato de calcio sustituido con magnesio

amorfo (AMCP), en donde el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo atrapa un resto detectable, en donde la composición del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo es capaz de distribuir el material de carga a un sitio de interés en el tracto gastrointestinal.

5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un proceso para producir las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo que contienen el material de carga biológicamente activo atrapado, el proceso comprende:

- 10 (a) proporcionar una solución que comprende iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), iones magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) y una solución que comprende iones fosfato ( $\text{PO}_4^{2-}$ ), en donde una o ambas de las soluciones comprenden uno o más materiales de carga biológicamente activos;
- (b) mezclar la solución que comprende los iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), los iones magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) con la solución que comprende los iones fosfato ( $\text{PO}_4^{2-}$ ), para precipitar el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo en el cual los materiales de carga biológicamente activos son atrapados;
- 15 (c) recuperar el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo; y
- (d) opcionalmente lavar y secar el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo.

20 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición para el uso en un método de tratamiento o prevención de un trastorno autoinmunitario, por la distribución de un material de carga biológicamente activo al tracto gastrointestinal, en donde la composición comprende el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo el cual atrapa el material de carga biológicamente activo, con lo cual hace posible que el material de carga sea distribuido a un sitio de interés en el tracto gastrointestinal. Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios incluyen esclerosis múltiple, enfermedad celiaca, diabetes tipo 1 y lupus eritematoso sistémico (SLE por sus siglas en Inglés).

25 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición para el uso en un método de tratamiento o prevención del cáncer, por la distribución de un material de carga biológicamente activo al tracto gastrointestinal, en donde la composición comprende el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo (AMCP) el cual atrapa el material de carga biológicamente activo, con lo cual hace posible que el material de carga sea distribuido a un sitio de interés en el tracto gastrointestinal. Los ejemplos de usos médicos de la presente invención con relación al tratamiento o

30 prevención del cáncer, son como por ejemplo, Leucemia Mieloide, tal como la Leucemia Mielogénica Crónica (CML por sus siglas en Inglés) Leucemia Linfoblástica Aguda y Leucemia Mielogénica Aguda (AML por sus siglas en Inglés).

Los presentes inventores han encontrado que después de la síntesis, el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo comprende nanopartículas agregadas que son capaces de dispersarse para distribuir la molécula de carga biológicamente activa al sitio interés. Esto tiene la ventaja de que los materiales forman nanopartículas en ambientes biológicos para la distribución de la carga, mientras que son fáciles de purificar y procesar después de la síntesis. Ventajosamente, las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo se dispersan eficientemente en ambientes acuosos en presencia de proteína, adaptándolas a la distribución del material de carga en los ambientes *in vivo*.

40 En algunas aplicaciones, los presentes inventores encontraron que las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención tienen la ventaja significativa de que son una plataforma de distribución silenciosa que no provoca una respuesta de adyuvante y/o una respuesta transcripcional directa hacia las nanopartículas en el sitio de interés. Por ejemplo, las células que han absorbido y procesado las nanopartículas no tienen una respuesta que difiera substancialmente de la respuesta al material de carga biológicamente activo solo y/o a las células de control no retadas. En consecuencia, en algunos casos, las nanopartículas del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo son silenciosas en el sentido de no modular una respuesta transcripcional directa que difiere entre células retadas con las nanopartículas y las células control no retadas, preferentemente como es evaluado dentro de 3 horas de la exposición a las nanopartículas del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo. Esto puede ser determinado en un experimento basado en la Figura 10, en la cual se mostró que esta correlación en la respuesta transcripcional directa de los genes el AMCP sintético comparado a las células normales, cae preferentemente dentro de un intervalo de regulación dos veces hacia arriba y dos veces hacia abajo.

55 Esta característica distingue las composiciones de la presente invención de los sistemas de distribución de la técnica anterior, donde el material a partir del cual es formado el agente de distribución, produce una respuesta de adyuvante además de la respuesta provocada por un antígeno distribuido. En algunas modalidades, las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención pueden ser utilizadas para dirigir la distribución de las moléculas de carga a tipos celulares que absorben preferentemente las nanopartículas. A manera de ilustración, esto incluye las células en el tracto gastrointestinal, tales como las células inmunitarias presentadoras de antígeno de los folículos linfoides intestinales. Los tipos celulares que absorben preferentemente las nanopartículas incluyen las células B presentadoras de antígeno pero son especialmente las células dendríticas y los macrófagos, tales como las células positivas a CD11b y CD11c.

65 Alternativa o adicionalmente los presentes inventores encontraron además que las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención tienen la ventaja significativa de que las composiciones son estabilizadas en una fase amorfa por los iones magnesio y/o el material de carga biológicamente activo. En este

contexto, en el campo de química inorgánica, se ha reconocido que la sustitución de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en ACP por los iones  $\text{Mg}^{2+}$  conduce a mayor estabilidad del estado amorfo, disminuyendo su tendencia a convertirse a fases cristalinas. Boskey & Posner (1973, 1974) mostraron que a una proporción de al menos 1:25 (Mg: Ca), pudo ser producida una fase amorfa de  $\text{MgCaPO}_4$  la cual, como un polvo anhidro, permanece estable con el tiempo. No obstante, los presentes inventores reconocieron por primera vez que durante su síntesis, el fosfato cálcico amorfo estabilizado por los iones magnesio (AMCP) es especialmente útil para atrapar una amplia gama de materiales de carga, incluyendo moléculas de carga, tales como antígenos proteicos, citosinas bioactivas, peptidoglicanos, moléculas orgánicas de bajo peso molecular, y nanopartículas de carga, tales como nanopartículas inorgánicas. Esto a su vez se abre hacia una gama de diferentes aplicaciones para las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención. Los ejemplos específicos de las moléculas de carga incluyen pero no están limitados a, muramil-dipéptido (MDP por sus siglas en Inglés), lipopolisacáridos (LPS), ácido poliinosínico: policitidílico (Poli I:C) y ácido retinoico (RA).

Además, los presentes inventores encontraron que los procesos sintéticos de la presente invención pueden ser utilizados para formar las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo (Mg, Ca,  $\text{PO}_4$ ) en las cuales las moléculas de carga asociadas a la composición son al menos parcialmente incorporadas dentro del material, en vez de ser simplemente enlazadas a la superficie de las partículas. Esto significa que las platillas de la composición de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo alrededor del material de carga en cierto grado dan la apariencia de la formación de materiales porosos en general. En otras palabras, mediante co-precipitación de las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo en presencia de otros materiales de carga, conduce al menos a que algunos de estos otros materiales de carga se lleguen a atrapar en el material durante la síntesis. Ventajosamente, esto puede proteger mejor la carga en ruta a la célula objetivo *in vivo*, en comparación a si la carga fuera únicamente adsorbida hacia la superficie.

Además, la presente invención demuestra que las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención son capaces de dispersarse para formar nanopartículas que contienen los materiales de carga que son susceptibles a la absorción por las células, conduciendo a la liberación de los materiales de carga después de la digestión celular, y proporcionando en consecuencia una respuesta celular típica al material de carga. Por ejemplo, el peptidoglicano bacteriano puede ser atrapado por las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo, cuando es distribuido a las células, dará origen a la producción de citosinas (IL-10-; IL-1;  $\text{TNF}\alpha$  etc.) típicas del peptidoglicano bacteriano. Como se estableció anteriormente, los presentes inventores encontraron sorprendentemente que la carga incrustada en las partículas recapitula fehacientemente las señales celulares derivadas de la carga únicamente, es decir, no existe atenuación de la señalización en ninguna dirección.

Ventajosamente, las nanopartículas del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo no son tóxicas y son seguras para la absorción por las células. Se reconoce en general en la técnica que las partículas amorfas son más seguras para las células que las partículas cristalinas. Las células, que están expuestas a y absorben las partículas de la presente invención no mueren, de manera contraria a la exposición prolongada a la hidroxiapatita de fosfato de calcio, por ejemplo.

Además, las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención pueden ser utilizadas para co-distribuir dos o más materiales de carga diferentes. Por ejemplo, los experimentos descritos en la presente han demostrado que si el peptidoglicano y el antígeno están ambos presentes, entonces la respuesta de células T subsecuente hacia el antígeno es significativamente reducida debido a que IL-10 que es secretada debido a la presencia del peptidoglicano.

También se describe en la presente solicitud la observación de que las células con las que están asociadas las nanopartículas de fosfato de calcio amorfo endógeno, en el intestino, muestran expresión reducida o la ausencia del ligando uno de muerte programada por proteína (PD-L1) en la enfermedad de Crohn, que está de otro modo presente en las células saludables correspondientes. PD-L1 es una molécula inductora de tolerancia que implica que la causa de la enfermedad o trastorno puede estar relacionada a la falla de estas células para expresar PD-L1. En consecuencia, en este aspecto, la presente invención proporciona un agente para el uso en un método de tratamiento del trastorno inflamatorio del intestino, tal como la enfermedad de Crohn, en donde el agente tiene la propiedad de (a) aumentar la expresión de PD-L1; o (b) activar la proteína PD-L1; o (c) inhibir la expresión de la expresión de PD-L1; o (d) activar de otro modo PD-L1 sobre las mismas células presentadoras de antígeno de los folículos linfoides intestinales. En aspectos relacionados, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende tal agente, en donde el agente es atrapado como un material de carga dentro de un material de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención.

Las modalidades de la presente invención serán ahora descritas a manera de ejemplo y no de limitación, con referencia a las figuras anexas. Sin embargo, diversos aspectos y modalidades adicionales de la presente invención serán aparentes para aquellos expertos en la técnica en vista de la presente descripción.

“Y/o” donde se utiliza en la presente, tiene que ser considerado como la descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo “A y/o B” debe ser considerado como la descripción específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, justo como si cada uno fuera individualmente en la

presente.

Cualquier referencia en la descripción a tratamientos, a métodos de tratamiento o a métodos de diagnóstico/formación de imágenes *in vivo* se refiere a las composiciones de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento o para uso en métodos de diagnóstico/formación de imágenes.

A no ser que el contexto lo dicte de otro modo, las descripciones y las definiciones de las características descritas anteriormente no están limitadas a algún aspecto o modalidad particular de la invención, y aplican igualmente a todos los aspectos y modalidades que son descritas.

### Breve descripción de los dibujos

**Figura 1.** Caracterización de STEM tallo de las nanopartículas de AMCP sintéticas: Figura 1a) imagen de STEM en campo oscuro anular de ángulo alto de grupos de partículas de AMCP sintéticas (barra de escala 20 nm) y Figura 1a) composición elemental a modo de ejemplo mediante microanálisis de rayos-X dispersivo de energía, (Figura 1b) una serie de ortorebanadas de una partícula de AMCP sintética (barra de escala 20 nm) (figuras 1c-1e) que revela una estructura interna detallada (figura 1i) a partir del volumen reconstruido (figura 1f) por medio de diversas ortorebanadas a través del plano XY y (figuras 1g-1i) vistas de transparencia a través de las orientaciones YZ, XZ, y XY respectivamente.

**Figura 2.** Microscopio electrónico de transmisión (figura 2a) y reconstrucción de tomografía 3D de las partículas de AMCP formadas en presencia de nanopartículas de óxido de hierro (figura 2b)(ver Ejemplo 8) y que muestra cómo algunas son atrapadas dentro de las AMCP como se muestra en las figuras 2a-2c. E % incorporación de BSA y Pg en las partículas de AMCP como son preparadas en los ejemplos 2 y 3.

**Figura 3.** Un análisis de ICP-OES de los elementos Calcio y Fósforo presentes en las partículas de AMCP después de la síntesis y después de la dilución en el medio de cultivo tisular. (figura 3a) Distribución de tamaño de las partículas de AMCP (figura 3b) preparadas como en los Ejemplos 2 y 4 (después de la re-suspensión y dilución en el medio de cultivo de tejidos) y analizadas mediante análisis de nanorastreo (NTA) utilizando la nano-observación.

**Figura 4.** Porcentaje medio de APC altas en CD14+ en CD107a de calceína doble dentro de las PBMC después de 3 horas de incubación con AMCP/BSA y AMCP/BSA/Pg medido mediante formación de imágenes citométrica de flujo (n = 4). (Figura 4a) Imágenes representativas de las células CD14+ que muestran partículas internalizadas (Calceína+) y la co-localización de las partículas con el marcador lisosomal CD107a, medido mediante formación de imágenes citometría de flujo (datos provenientes de las PBMC de 1 control saludable, son mostrados). (figura 4b). Proporciones logarítmicas de las señales (SLR) para AMCP/BSA/sPg vs control, fueron trazadas gráficamente sobre el eje-y, SLR para sPg vs., el control fueron trazadas gráficamente sobre el eje-x. (figura 4c) Cada punto representa un gen único. La curva de correlación perfecta fue traslapada sobre los datos y los límites correspondientes al aumento/disminución doble lineal (tradicionalmente el cambio proporcional mínimo requerido para indicar una "diferencia" potencial) calculada por la adición de +1 o -1 a cada punto de la línea de correlación perfecta.

**Figura 5:** La Portación Doble de Lipopolisacárido (LPS) y el antígeno PPD de las células T inhiben la proliferación de células T CD4+ específicas del antígeno PPD. Figura 5a: gráficas de flujo a modo de ejemplo que muestran las células en división CD4+CD3+ (CFSE bajo) en un ensayo de proliferación de CFSE; las células dentro de una compuerta de linfocitos vivos fueron introducidas para CD4 y trazadas gráficamente CD3 versus CFSE. Figura 5b: Se muestra la proliferación de las células T CD4+CD3+ en las PBMC en el día 5, en respuesta a los datos por medio de la combinación del antígeno PPD/antígeno-LPS, solubles y en partículas, provenientes de 5 PPD respondedores. Las células CD4+CD3+ bajas en CFSE dentro de la población de PBMC en respuesta a la estimulación mostrada como índices de estimulación. Figura 5c: Ensayos de células T de proliferación de células T CD4+CD3+ de CFSE con el bloqueo de PD-L1 e IL-10R. Se muestran los datos promedio de 6 respondedores de PPD. En todos los ensayos de proliferación fue considerada una respuesta de PPD significativa si la fracción de proliferación era del 2 % o mayor y tuvo un índice de estimulación de 4 o superior.

**Figura 6.** Secreción de IL-1  $\beta$  a partir de las PBMC que fueron primeramente pre-estimuladas con PLS por 3 horas (10 ng/ml, columnas a rayas), o sin (columnas solidas), para inducir pro-IL1 $\beta$  y luego posteriormente incubadas (3 horas) con un control negativo (es decir el medio de cultivo de tejidos) AMCP/BSA (figuras 6a-6b) sPg y AMCP/BSA/sPg(figuras 6c-6d).

**Figura 7.** Respuestas de IL-1 $\beta$  (figura 7a) e IL-10 (figura 7b) en las PBMC que fueron estimuladas con o sin LPS (3 horas; 10 ng/ml) y luego retadas con sPg y AMCP/BSA/sPg desafiado por otras 3 horas (n=2). Los sobrenadantes fueron analizados después de 3 horas de reto y con una persecución adicional de 21 horas.

**Figura 8.** Micrografías confocales de las células intestinales de las placas de Peyer en individuos saludables (figura 8a; grises) y con enfermedad de Crohn (figura 8b; azul) que muestran la AMCP internalizadas (verde) e inducidas o carentes de PD-L1 (rojo) en salud y enfermedad, respectivamente.

**Figura 9.** Patrones de difracción de rayos-X de las nanopartículas de fosfato de calcio, preparadas en (figura 9a) la ausencia de magnesio (Mg) y albúmina sérica bovina (BSA), (figura 9b) en presencia de 0,9 mM (Mg; concentración final), (figura 9c) Mg 1,8 mM, (figura 9d) Mg 1,8 mM y BSA, (figura 9e) Mg 3,6 mM y (figura 9f) Mg 3,6 mM y BSA.

**Figura 10.** Valores de expresión log2 promedio de los genes, después de 3 horas de exposición a las AMCP sintéticas, correlacionadas contra aquellas del tratamiento con vehículo control (n=7) y que demuestran que las células retas con las nanopartículas de AMCP sintéticas, cargadas con proteína mostraron una “firma” transcriptómica similar a, aquellas de las células no retadas (control). La línea teórica de la correlación perfecta es mostrada en la línea central, mientras que las líneas de límite corresponden al aumento y disminución dobles.

**Figura 11.** Parche del ciego que muestra tinción evidente con calceína (verde)(figura 11a) en el área sub-epitelial indicando que, además de las placas de Peyer, las placas linfoides inmunoactivas del apéndice también absorben el nanomineral endógeno. Los núcleos mostrados en gris; barras de escala de 50  $\mu$ m. Nódulos linfáticos mesentéricos murinos que muestran números significativos de células con AMCP (verde) (figura 11b) nanomineral+.

## Descripción detallada

### Fosfato cálcico amorfo

El fosfato de calcio amorfo (ACP) es único entre todas las formas de fosfato de calcio, ya que carece del orden a escala atómica periódica, de amplio intervalo de los fosfatos de calcio cristalinos. Esto significa que el ACP puede ser conocido a partir de su patrón de difracción de rayos-X amplio y difuso con un máximo de 25 grados 2 theta, y sin otras características diferentes comparadas con la hidroxiapatita bien cristalizada. Adicional o alternativamente, los fosfatos de calcio amorfos pueden ser caracterizados como materiales de fosfato de calcio en los cuales el análisis mediante XRD muestra la banda amplia típica que se eleva a aproximadamente 31 2 theta y que se extiende desde 22 hasta 36 2-theta (por ejemplo, los difractogramas en las figuras 9d-9f). Nótese que esta banda ancha es distinta del pico mucho más agudo a 32 2-theta que está presente en los materiales de hidroxiapatita (por ejemplo, los difractogramas en las Figuras 9a-9f). La banda XRD ancha es también característica de las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención como se muestra en las figuras 9a-9c. En contraste, los patrones de difracción de XRD para al menos los materiales parcialmente cristalinos de Dasgupta et al. y Chowdhur et al (*supra*) se asemejan más estrechamente a aquellos de la hidroxiapatita. La comparación de los patrones de difracción de rayos-X para el fosfato de calcio amorfo y la hidroxiapatita cristalina, se muestran en las Figuras 9a-9f y la persona experta en la técnica puede determinar fácilmente si una forma de fosfato de calcio es o no amorfa mediante difracción de rayos-x, mediante la comparación de los patrones con aquellos mostrados en las Figuras 9a-9f. Bajo microscopio electrónico, la forma morfológica de la ACP es mostrada como partículas esferoidales pequeñas en la escala de décimas de nanómetro. En consecuencia, como se utilizan en la presente, ACP y AMCP (“fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo”) se refieren a tales formas amorfas del fosfato de calcio, y no incluyen formas cristalinas del fosfato de calcio, tales como la hidroxiapatita.

En general, los presentes inventores han encontrado que cuando las composiciones del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención son sintetizadas, éstas son producidas en la forma de partículas aglomeradas que son susceptibles a la purificación, por ejemplo mediante filtración y/o centrifugación, y el procesamiento utilizando otras técnicas, tales como el secado y formulación de los materiales en composiciones para almacenamiento y uso. Será aparente para aquellos expertos en la técnica que un excipiente apropiado puede ser agregado a la formulación para reducir al mínimo o para prevenir la agregación durante el secado u otros procesos de fabricación. Sin embargo, los presentes inventores han encontrado ventajosamente que cuando las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo son derivadas en un ambiente adecuado que podría existir clínicamente o en un ambiente biológico, que los materiales se redispersan en la forma de nanopartículas que tienen las características descritas en la presente. Esto significa, por ejemplo, que las nanopartículas tienen un tamaño compatible con la absorción celular. En consecuencia, como se utiliza en la presente, “un aglomerado” se refiere a una colección de partículas enlazadas de manera relativamente suelta, que son capaces de dispersarse en partículas individuales, tales como nanopartículas, en respuesta al cambio de ambiente.

Preferentemente, las composiciones de fosfato de calcio sustituidas de magnesio amorfo empleadas en la presente invención tienen las siguientes características. Preferentemente, la proporción del Mg al Ca en las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo es al menos 1:25, opcionalmente al menos 1:20, opcionalmente al menos 1:10, opcionalmente al menos 1:5, opcionalmente al menos 1:4 y lo más opcionalmente al menos 1:3.

En general, cuando las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo están en forma acuosa, por ejemplo después de la distribución, éstas se dispersan para formar composiciones de nanopartículas. En general, las nanopartículas tienen diámetros medios dentro del intervalo de tamaño de 5 nm a 500 nm de diámetro, diámetros medios en un intervalo entre 20 nm y 350 nm más preferentemente diámetros medios en un intervalo entre 20 nm y 200 nm, más preferentemente diámetros medios en un intervalo entre 20 nm y 150 nm más preferentemente diámetros

medios en un intervalo entre 75 nm y 150 nm. Dentro de un intervalo de tamaño dado, se prefiere que al menos 75 % de las nanopartículas del fosfato de calcio sustituido de magnesio amorfo tengan un diámetro promedio en el intervalo, y más preferentemente que al menos 90 % de las nanopartículas del fosfato de calcio sustituido de magnesio amorfo tengan un diámetro promedio en el intervalo. El tamaño de partícula puede ser evaluado mediante el Análisis de Rastreo de Nanopartículas, por ejemplo utilizando un aparato Nanosight NS500 (Nanosight, Amesbury, UK) utilizando el Software Analítico NTA2.2.

Como se explica más adelante, las composiciones de fosfato de calcio sustituido de magnesio amorfo de la presente invención aparecen porosas, ya que éstas han atrapado o tienen como plantilla alrededor los materiales de carga tales como las moléculas de carga o las nanopartículas de carga. La porosidad de las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo representa una combinación de los poros verdaderos, y los poros que contienen parcial o totalmente la carga orgánica para la cual el microscopio electrónico es "ciego" ya que éste muestra regiones de mineral y sus orificios que son regiones (poro) de no mineral. Esto puede ser observado mediante TEM, mejor por STEM y todavía mejor por tomografía STEM. BET o intrusión de mercurio pueden proporcionar medidas de los poros verdaderos que no son ocupados por carga. Normalmente, el tamaño de los poros en las nanopartículas son de 10 nm o menor, más preferentemente 5 nm o menor, y lo más preferentemente de aproximadamente 1-3 nm. En general, cuando éstas están en la forma de nanopartículas, las partículas del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo son de forma aproximadamente esférica o esférica alargada.

La estabilidad de las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención es una ventaja clave de los materiales de la presente invención y esto surge, en parte, de la presencia de los iones magnesio en el material. La fase de AMCP amorfa ( $MgCaPO_4$ ) podría ser producida, la cual, como un polvo seco, permanece estable con el tiempo. Preferentemente, esta contiene al menos un átomo de Mg por cada 25 átomos de Ca y no más de un ion Mg por cada uno de los iones de Ca. Las proporciones Mg:Ca más preferidas son al menos 1:20, más preferentemente 1:10 y más preferentemente al menos 1:5 de iones Mg:Ca, más preferentemente, al menos 1:4 de iones Mg:Ca o al menos 1:3 de iones Mg:Ca.

#### **Modelación por ordenador de las nanopartículas de fosfato de calcio sustituido con magnesio**

Primeramente, la modelación de DFT principal fue emprendida utilizando CASTEP (Clark et al: First principles methods using CASTEP. Zeitschrift für Kristallographie: 220 (5-6): 567-570, 2005) (que es el código de simulación de onda plana). Los cúmulos de fosfato de calcio, precursor, pequeño, representantes de las etapas tempranas de la nucleación de partículas, fueron construidos y simulados.

El cúmulo de Posner (Posner, Acc. Chem. Res., 8: 273-281, 1975),  $(Ca_9(PO_4)_6)$ , es considerado como un precursor para la formación de la apatita cristalina. Esta estructura fue utilizada como un modelo inicial, pero la fórmula fue cambiada para reflejar una composición experimentalmente medida,  $MgCa_7(PO_4)_6$ . El análisis de la estructura geométrica de los cúmulos y la estabilidad de los mismos fue llevado a cabo. La estabilidad fue evaluada en términos termodinámicos, utilizando el análisis de energía de formación. Este análisis condujo a los siguientes resultados. En la composición experimentalmente medida anteriormente mencionada, el cúmulo es más estable con magnesio que con calcio. Esto no es cierto para el cúmulo de Posner, donde la sustitución del magnesio no es favorable.

Para realizar una sustitución de magnesio en la hidroxiapatita cristalina (HA), es requerida energía, y por lo tanto la energía de formación de la sustitución es positiva. La energía de formación de la misma sustitución en el cúmulo de composición experimentalmente medido, es negativa, y por lo tanto más favorable. Esto muestra que el magnesio en el cúmulo experimental estabiliza la estructura amorfa contra la cristalización. La posición más favorable para la sustitución del magnesio es exactamente en el centro del cúmulo. Esta es la posición donde el ion magnesio es más estable.

La geometría del cúmulo es mucho "más suelta" cuando se compara al cúmulo de Posner sustituido y al cúmulo sin el magnesio. En comparación a un cúmulo de Posner sustituido, la distancia Mg-P es 2,5 % más grande y la distancia P-P es 5 % más grande. El cúmulo pierde su geometría esférica, mostrando un cúmulo que parece más amorfo con enlace más débil.

#### **Material de carga atrapado**

Los experimentos descritos en la presente muestran que es posible atrapar uno o más materiales de carga en las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención.

	Peso total (mg)	Material orgánico (µg)	Ca:P:M inicial (n=2)	Ca:P:Mg de síntesis (n=2)	Proporción molar de Ca/P de síntesis (N=2)	Proporción molar de (Ca+Mg)/P de síntesis (n=2)
AMCP	2,19	-	1:1,3:0,26	1:0,9:0,16	1,11	1,29
AMCP/Avidina	-	157,8	-	-	-	-
AMCP/BS A	2,39	242,9	1:1,25:0,25	1:0,9:0,16	1,11	1,29
AMCP/BS A/PGN	1,98	315,7	1:1,27:0,25	1:0,98:0,17	1,02	1,19
AMCP/BS A/sPGN	-	245,8	-	-	-	-
AMCP/BS A/Almidón	-	46,0 (Almidón)	-	-	-	-
AMCP/BS A/PPD	-	240,5	-	-	-	-
AMCP/BS A/TSLP	-	≤ 1,4,10 <sup>-3</sup> (TSLP)	-	-	-	-

### **Nanopartículas como materiales de carga**

5 Las estructuras de nanopartículas pueden tener beneficio terapéutico ya sea directamente por sí mismas o debido a la portación de un agente terapéutico dentro de las mismas. Las nanopartículas pequeñas, en general de <20nm, preferentemente de <15 nm y lo más preferentemente de <10 nm de diámetro pueden ser fácilmente incorporadas en las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención. Esto puede tener la ventaja de dirigir las nanopartículas pequeñas a donde, de otro modo, éstas no serían dirigidas. Por ejemplo, el ARN de interferencia para la gripe pandémica puede ser incorporado en nanopartículas pequeña dirigidas al núcleo, las cuales por sí mismas son incorporadas en una composición de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo para permitir la distribución inicial a las vías respiratorias superiores por inhalador o un dispositivo similar, y para hacer posible que la composición de fosfato de calcio sustituida con magnesio amorfo se disuelva en el fluido de revestimiento pulmonar antes de liberar las partículas más pequeñas para el viaje y distribución posteriores a las células epiteliales más profundas.

15 Un segundo ejemplo es el hierro terapéutico. Por ejemplo, puede ser deseable desviar o reducir la degradación gástrica. Un ejemplo de esto es el hidróxido de hierro en nanopartículas, como el núcleo de ferritina que se puede desear distribuir al intestino delgado intacto, de modo que estos son absorbidos totalmente en el intestino delgado a través endocitosis, y luego se disuelven intralisosomalmente para la utilización del hierro (Fe).

20 En otros aspectos, la presente invención permite la distribución de nanopartículas metálicas o de nanopartículas de oxo-hidróxido metálico, tales como las nanopartículas de hierro o cobre, o puntos cuánticos utilizando las composiciones de calcio sustituido con magnesio amorfo, las cuales pueden ser deseables para la experimentación por ejemplo, permitiendo que la carga de las partículas sea rastreada, tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*. En consecuencia, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición para el uso en un método de diagnóstico, que comprende el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo (AMCP) el cual atrapa un material de carga que comprende una porción detectable, tal como un marcador. En una modalidad, esto puede involucrar la distribución de un material de carga hacia el tracto gastrointestinal, con lo cual se hace posible que el material de carga sea distribuido a un sitio de interés en el tracto gastrointestinal, y detectado utilizando una técnica capaz de detectar la porción detectable.

30 En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un método de diagnóstico que comprende administrarle a un sujeto una composición que incluye el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo (AMCP) el cual atrapa un material de carga que comprende una porción detectable, distribuyendo el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo que comprende el material de carga hacia el tracto gastrointestinal, y detectando la porción detectable.

### **Vacunas como materiales de carga**

40 Las terapéuticas pueden requerir a) la dirección hacia un tipo celular específico y/o b) para ser protegido de la digestión durante el tránsito gastrointestinal. La composición de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención puede ofrecer ventajas en ambos casos. Primeramente, al dirigirse a las APCs y/o a las células retículo-endoteliales administrado ya sea oralmente, rectalmente o parenteralmente. Por las razones descritas en la presente, la composición de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención es muy adecuada para la distribución de materiales de carga a las placas de Peyer y a los nódulos linfáticos mesentéricos (MLN). El segundo lugar, mediante la provisión de alguna protección hacia la digestión por las enzimas. Un ejemplo sería la vacunación. La vacuna, la cual comprende una o más moléculas de carga, puede ser incorporada en las composiciones de calcio sustituido con magnesio amorfo, para alcanzar ambas o una de las metas anteriores. Un segundo ejemplo es la

distribución terapéutica en el trastorno inflamatorio del intestino, artritis reumatoide u otros trastornos inflamatorios o autoinmunitarios. Puede ser benéfico que un agente terapéutico específico tal como un esteroide, metotrexato, azatioprina o incluso "agentes biológicos" que son utilizados como terapias no dirigidas, sean de hecho empaquetados en las composiciones de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención, y dirigidos a las APCs y las células relacionadas.

Sin desear estar comprometidos por alguna teoría particular, los presentes inventores creen que las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo pueden ser utilizadas para tratar condiciones tales como condiciones autoinmunitarias, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide u otros trastornos inflamatorios por la inducción de tolerancia oral para moderar las respuestas sistémicas y/o locales que son subyacentes a estas condiciones. Mientras que los materiales oralmente consumidos que no han sido digeridos pueden ser atrapados por las nanopartículas de fosfato de calcio endógenamente producidas, y llevadas a las células relevantes, este proceso es relativamente ineficiente en comparación a la exposición celular a un material de carga ya presente en las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo, sintéticas, de la presente invención.

### **Moléculas de carga de ácidos nucleicos**

Las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo pueden ser utilizadas para distribuir materiales de carga que son secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo para obtener la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos en una célula, la distribución de secuencias cortas de ácidos nucleicos para la supresión de genes y similares. En general, el ácido nucleico puede ser una secuencia desnuda o incluso incorporada dentro de un vector de expresión. El ácido nucleico puede ser total o parcialmente sintético y puede incluir ADN genómico, cADN o ARN. Donde el ácido nucleico de acuerdo a la invención incluye el ARN, la referencia a la secuencia mostrada deben ser consideradas como referencia al equivalente de ARN, con la U sustituida por T.

Las secuencias de ácido nucleico, por ejemplo que codifican para todo o parte de un gen y/o sus elementos reguladores, pueden ser fácilmente preparadas por la persona experta utilizando la información y las referencias contenidas en la presente, y las técnicas conocidas en la materia (por ejemplo, ver Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989, and Ausbel et al, Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, 1992). Estas técnicas incluyen (i) el uso de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) para amplificar las muestras de tal ácido nucleico, por ejemplo a partir de fuentes genómicas, (ii) la síntesis química, o (iii) la amplificación en *E. Coli*. Las modificaciones a las secuencias de ácido nucleico pueden ser realizadas, por ejemplo, utilizando la mutagénesis dirigida al sitio, para tomar en cuenta la preferencia de codón en las células hospederas utilizadas para expresar el ácido nucleico. Las técnicas de PCR para la amplificación del ácido nucleico son descritas en la Patente de los Estados Unidos No. 4.683.195. Las referencias para el uso general de las técnicas de PCR incluyen Mullis et al, cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol., 51:263, (1987), Ehrlich (ed.), PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989, Ehrlich et al, Science, 252:1643-1650, (1991), "PCR protocols; A Guide to Methods and Applications", Eds. Innis et al, Academic Press, New York, (1990).

Con el fin de obtener la expresión de una secuencia de ácido nucleico, ésta puede ser incorporada en un vector que tiene secuencias de control operablemente enlazadas al ácido nucleico para controlar su expresión. El vector puede incluir otras secuencias tales como promotores o aumentadores para impulsar la expresión del ácido nucleico insertado, las secuencias de ácido nucleico de modo que el polipéptido codificado por el gen es producido como una fusión y/o el ácido nucleico que codifica las señales de secreción, de modo que el polipéptido producido en la célula hospedera es secretado desde la célula. Los vectores adecuados pueden ser elegidos o construidos, conteniendo secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias aumentadoras, genes marcadores y otras secuencias, como sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos o virales, por ejemplo, "fago, o fagémido, como sea apropiado. Para detalles adicionales ver, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press. Muchas técnicas conocidas y los protocolos para la manipulación del ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciamiento e introducción de ADN dentro de las células y la expresión de genes, y el análisis de proteínas, son descritas con detalle en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992. El ácido nucleico o los vectores de expresión pueden ser transfectados dentro de las células objetivo utilizando nanopartículas dentro de las cuales las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención se dispersan en el uso, de modo que el ácido nucleico que codifica para un gen de interés es expresado en las células objetivo.

### **Moléculas de carga de polipéptido**

Las nanopartículas del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo pueden ser utilizadas para distribuir moléculas de carga que son péptidos o polipéptidos, por ejemplo antígenos proteicos o citocinas. Los polipéptidos, como se utilizan en la presente, incluyen polímeros en los cuales los monómeros son aminoácidos y están unidos entre sí a través de enlaces amida. Los aminoácidos que forman los polipéptidos pueden incluir aminoácidos no naturales, tales como  $\beta$ -alanina, fenilglicina y homoarginina, o aminoácidos que son codificados por ácidos nucleicos, y/o aminoácidos que han sido modificados para incluir grupos reactivos, sitios de glucosilación, polímeros, porciones terapéuticas, biomoléculas y similares que pueden también ser utilizados en la presente invención. Todos los amino ácidos utilizados

en la presente invención pueden ser ya sea de las formas D – o L. el uso del isómero-L de origen natural es en general preferido.

Los métodos descritos son aplicables a cualquier tamaño o tipo de polipéptido proveniente de aminoácidos sencillos y los péptidos a polipéptidos y proteínas que tienen pesos moleculares de hasta o superiores a 100kDa, y en casos excepcionales, tales como la ferritina, de hasta o excediendo 1 millón de kDa. En consecuencia, mientras que por conveniencia los métodos de la presente son en general descritos por referencia a los “polipéptidos”, esto debe ser tomado en cuenta para incluir secuencias más cortas de aminoácidos (por ejemplo, de 2, 3, 4, 5 o 10 aminoácidos de longitud hasta 30, 40 o 50 aminoácidos de longitud), algunas veces denominados en la técnica como “péptidos”, así como a polipéptidos más grandes en general denominados como proteínas. El término debe ser también considerado para incluir los polipéptidos que tienen estructura secundaria, terciaria o cuaternaria, en general denominados como proteínas, así como proteínas de dominios múltiples u otras proteínas críticas y polipéptidos en procesos de enfermedad.

Los ejemplos de clases adecuadas de polipéptidos incluyen interferones, interleucinas, quimiocinas, linfocinas y citocinas, por ejemplo para el acondicionamiento y la re-educación celular, alérgenos (es decir, orales o sistémicos), proteínas bacterianas y proteínas autoinmunitarias.

#### ***Patrones moleculares asociados a microbios, como moléculas de carga***

Las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo pueden ser utilizadas para distribuir moléculas de carga que abarcan patrones moleculares asociados a microbios (MAMP por sus siglas en inglés), tales como los peptidoglicanos. Los ejemplos de MAMP incluyen lipopolisacáridos, muramil-dipéptido, ácidos lipotoqueicos o cualesquiera moléculas que puedan acoplarse a los receptores similares al peaje celular y/o a receptores similares a NOD intra-celulares, y miembros de la familia asociados. Los MAMP pueden ser utilizados ya sea por sus propiedades inflamatorias (adyuvante) o anti-inflamatorias (tolerogénicas) dependiendo del ambiente celular. Por ejemplo en el tracto gastrointestinal la omisión es una de la tolerancia. En la periferia, existe una de la capacidad de respuesta inmunitaria. Es conocido en la técnica que en cultivo las células pueden ser condicionadas para intentar o imitar su estado inmuno-tolerante intestinal. El peptidoglicano puede ser distribuido dentro de las células objetivo, *in vivo* o *ex vivo* con condicionamiento apropiado, utilizando las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención, de modo que las señales tolerogénicas son inducidas en la célula de interés. Por ejemplo, la IL-10 puede ser secretada y PD-L1 aumentada. Si adicionalmente la partícula lleva un antígeno, entonces la respuesta de células T hacia el antígeno presentado puede ser útilmente tolerogénica. En condiciones tales como la enfermedad de Crohn de donde esta vía puede no ser operacional, otros materiales podrían ser considerados como se discute posteriormente en otro sitio en la presente.

#### ***Moléculas pequeñas como moléculas de carga***

Las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo pueden ser utilizadas a propósito para atrapar y para distribuir moléculas pequeñas tales como nutrientes. Esto puede tener beneficio en un número de formas. Primeramente, para los nutrientes que son sinergistas con el beneficio nutricional del calcio, especialmente el magnesio, el silicio y la Vitamina D. En segundo lugar, las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo pueden actuar para proteger parcial o completamente al nutriente de la digestión por las nanopartículas dentro de las cuales las composiciones de la presente invención se dispersan por disolución en el estómago, y de este modo retrasan el tiempo en que el ácido gástrico tiene que actuar sobre la composición de nutrientes dentro. Un ejemplo adicional involucra la distribución dirigida de las moléculas pequeñas tales como nutrientes, aminoácidos, ácidos nucleicos, incluyendo sus secuencias hacia las células que depuran específicamente las partículas de AMCP ya sea administradas oralmente o bien parenteralmente. Las APCs y las células reticuloendoteliales podrían ser especialmente dirigidas de esta manera.

#### ***Síntesis de materiales de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo***

La síntesis de las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención que contienen materiales de carga biológicamente activos, atrapados, fue adaptada de los métodos descritos por Boskey y Posner (1973, 1974), con la distinción de que sus materiales no atrapan material de carga biológicamente activo, y con algunos mejoramientos adicionales a sus métodos. En líneas generales, el proceso de la presente invención emplea iones magnesio ( $Mg^{2+}$ ) para estabilizar el fosfato de calcio en la fase amorfa. Sin embargo, los presentes inventores han encontrado que los materiales de carga biológicamente activos pueden proporcionar estabilización adicional más allá de aquella proporcionada por los iones magnesio ( $Mg^{2+}$ ) y que la eficiencia del paso de secado de los materiales precipitados juega un papel importante en la preservación de la fase amorfa.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un proceso para producir las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo que contienen material de carga biológicamente activo, atrapado, para uso en el tratamiento de prevención de una enfermedad como se describe en el presente documento, el proceso comprende:

- (a) proporcionar una solución que comprende iones calcio ( $Ca^{2+}$ ) iones magnesio ( $Mg^{2+}$ ) y una solución que

comprende iones fosfato ( $\text{PO}_4^{2+}$ ), en donde una o ambas de las soluciones comprenden uno o más materiales de carga biológicamente activos;

(b) mezclar la solución que comprende los iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), iones magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) con la solución que comprende iones fosfato ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) para precipitar el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo en el cual el material de carga biológicamente activo está atrapado;

(c) recuperar el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo; y

(d) opcionalmente lavar y secar el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo con el material de carga atrapado.

Convenientemente, la solución que comprende los iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), los iones magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) y la molécula de carga biológicamente activa es amortiguada, por ejemplo utilizando un tampón de Tris, HEPES, BICINE, TRICINE o de ácido cítrico, o un aminoácido, tal como lisina o glicina, a un pH entre pH 7,5 y pH 10, y más preferentemente a un pH de aproximadamente 8,0. Esto puede ser logrado utilizando un tampón de Tris a un intervalo de concentración de entre 60 mM y 300 mM, por ejemplo aproximadamente a 150 mM de Tris. En general, la concentración de los iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) está entre 5 mM y 200 mM, por ejemplo a aproximadamente 17,7 mM. En general, la proporción de los iones magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) a los iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es al menos 1:25, opcionalmente al menos 1:20, opcionalmente al menos 1:10, opcionalmente al menos 1:5, opcionalmente al menos 1:4 y opcionalmente al menos 1:3. La concentración de las moléculas de carga biológicamente activas depende de la cantidad de las moléculas que se desea atrapar en las nanopartículas precipitadas. A manera de ilustración, en aplicaciones donde la molécula de carga biológicamente activa es una molécula terapéuticamente activa, la concentración puede ser en general menor que para aplicaciones donde la molécula de carga biológicamente activa es una molécula nutracéutica.

La concentración de la solución de los iones fosfato ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) está entre 5 mM y 200 mM, por ejemplo a aproximadamente 20 mM, y es en general amortiguada en la misma solución tampón que la solución que comprende los iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), iones magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) y las moléculas de carga biológicamente activas. La adición rápida de la solución de los iones fosfato ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) a una solución de calcio aseguran que las proporciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{2-}$  sean constantes, mientras que es formada la fase de fosfato de calcio amorfo (ACP). En ausencia de estabilizadores, éste podría normalmente convertirse rápidamente a fases más cristalinas, tales como la hidroxiapatita. Esta conversión puede ser prevenida, o al menos limitada, por la adición de iones magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) en la síntesis la cual, al ser incorporados en el material de fosfato de calcio, perturba la red y reduce la remodelación superficial (Figuras 7a, 7b).

Mientras que la estabilización por el fosfato de calcio amorfo por los iones magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) fue primeramente investigada por Boskey & Posner (1974), los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que la estructura porosa de las nanopartículas es capaz de incorporar una gama de diferentes tipos de moléculas de carga biológicamente activas. Además, los presentes inventores encontraron que las moléculas de carga atrapadas dentro de la estructura de las nanopartículas incrementa adicionalmente la estabilización de la fase amorfa durante la síntesis y para el secado y almacenamiento subsecuentes. Esto hace posible que el proceso de la presente invención emplee menores concentraciones de iones magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) que Boskey & Posner encontraron como necesarios para estabilizar la fase de fosfato de calcio amorfo, por ejemplo 1,8 mM de Mg por 17,7 mM de Ca. Sin embargo, en general, concentraciones más altas de iones magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) son preferidas para aumentar la estabilidad de las nanopartículas producidas de este modo.

Convenientemente, la recuperación de las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención puede ser llevada a cabo mediante centrifugación o filtración, y las composiciones son luego lavadas y parcial o totalmente deshidratadas. Esta facilidad de manipulación es lograda debido a la aglomeración transitoria de las nanopartículas durante la síntesis a aglomerados de tamaño micrométrico que posteriormente se re-dispersaran en la forma nano cuando sean apropiadamente rehidratadas. Ventajosamente, los pasos de lavado y secado pueden ser realizados utilizando uno o más lavados con acetona para ayudar a eliminar el agua de las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo. Los presentes inventores han encontrado que una manera de lograr esto es re-suspender las composiciones en acetona (preferentemente a un pH de aproximadamente 10) y luego secar la composición utilizando centrifugación. Para la estabilización óptima de las composiciones, el paso de lavado con acetona fue repetido dos veces, ver Tabla 1 siguiente.

**Tabla 1.** Efecto de la concentración de Mg, proteína y secado con acetona sobre la fase mineral de los materiales producidos a partir de  $\text{Ca}^{2+}$  17,7 mM,  $\text{PO}_4^{2-}$  19,7 mM en Tris 150 mM a pH 8. Con base en estos hallazgos, la re-suspensión con acetona estabiliza la fase a través de la eliminación del agua y, por lo tanto, una re-suspensión en acetona puede tener un efecto equivalente a los pasos de re-suspensión con la condición de que suficiente agua sea eliminada del material.

[Mg], mM	Proporción Mg:Ca en la síntesis (reactivos)	Una re-suspensión en acetona		Dos re-suspensiones en acetona	
		Con Proteína	Sin Proteína	Con Proteína	Sin Proteína
0		Cristalino	Cristalino	Cristalino	Cristalino
0,9	1 : 19,7	Cristalino	Cristalino	Cristalino	Cristalino
1,8	1 : 9,8	Cristalino	Cristalino	Cristalino	Amorfo
3,6	1 : 4,9	Cristalino	Cristalino	Amorfo	Amorfo
7,2	1 : 2,5	Cristalino	NS	Amorfo	NS
14,4	1 : 1,2	Cristalino	NS	Amorfo	NS

\* NS = no sintetizado

La Tabla 2 muestra los resultados de los experimentos en los cuales la proporción Mg:Ca fue medida en la síntesis y en el material final.

5 **Tabla 2.** Proporción Mg:Ca y P:Ca en soluciones patrón y después de la síntesis de AMCP, determinado mediante ICP.

En la síntesis (reactivos)				Real (determinado en el material por ICP)			
	Final [Mg] mM	Proporción Mg:Ca	Proporción P:Ca	Proporción Mg:Ca (±SD)		Proporción P:Ca (±SD)	
				sin proteína	con proteína	sin proteína	con proteína
1	14,4	1:1,2	1:0,9	1:1,60 (0,004)	1:1,18 (0,01)	1:0,84 (0,03)	1:0,69 (0,01)
2	7,2	1:2,5	1:0,9	1:5,77 (0,02)	1:2,79 (0,05)	1:1,26 (0,03)	1:1,03 (0,01)
3	3,6	1:4,9	1:0,9	1:10,83 (0,04)	1:10,27 (0,2)	1:1,35 (0,01)	1:1,33 (0,02)
4	1,8	1:9,8	1:0,9	1:17,4 (0,3)	1:17,43 (0,1)	1:1,40 (0,02)	1:1,36 (0,03)
5	0,9	1:19,7	1:0,9	1:32,6 (0,5)	1:26,2 (0,3)	1:1,41 (0,04)	1:1,41 (0,02)
6	0	N/A	1:0,9	N/A	1:217* (8)	1:1,52 (0,04)	1:1,48 (0,02)

N/A: No aplicable

\*[Mg] derivado de la proteína

10 Los presentes inventores encontraron además que la incorporación de las moléculas de carga incrementa la estabilidad de fase del material en ambientes acuosos, lo cual es benéfico para aplicaciones biomédicas. Esto fue ejemplificado en los medios de cultivo de tejidos, donde las nanopartículas del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo cargadas con la molécula de carga de proteína, en este caso la proteína albúmina sérica bovina, requirió significativamente más tiempo para convertirse a hidroxiapatita (HA) que el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo no cargado, correspondiente (Tabla 3).

15 **Tabla 3.** Efecto de la incorporación de proteína sobre la estabilidad de fase del ACP estabilizado con ([Mg]= 3,6 mM) en medio de cultivo de tejidos elaborado de acuerdo al protocolo general descrito anteriormente a pH 10,0, lavado con acetona dos veces y secado toda la noche en el horno.

Tiempo (minutos)	Sin BSA	Con BSA
15	ACP	ACP
30	ACP	ACP
60	HA	ACP
180	HA	ACP
320	HA	--
24 horas	--	ACP

25 Muestras centrifugadas y lavadas dos veces con agua a pH 10,0. Muestras resuspendidas en D10 (mismo volumen que la mezcla de síntesis). Muestras centrifugadas y lavadas con agua de pH 10,0. Muestras centrifugadas y lavadas con acetona dos veces. Secadas toda la Noche en el Horno

Además, los presentes inventores han encontrado que incrementando el pH de la síntesis por arriba de pH 8,0, se pueden producir las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo con estabilidad de fase mejorada en comparación al material correspondiente sintetizado a pH 8,0, como es utilizado por Boskey & Posner (1974). En consecuencia, se prefiere que el pH durante los pasos (a) y/o (b) sea mayor de 7,5, preferentemente al menos pH 8,0, más preferentemente al menos pH 8,5, y lo más preferentemente al menos pH 9,0.

### **Formulaciones y usos**

Las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención pueden ser formuladas para el uso como agentes para la distribución de materiales de carga atrapados, tales como moléculas de carga o nanopartículas de carga, y pueden ser utilizados para tratar y/o prevenir condiciones que responden a las moléculas de carga, *in vitro* y/o *in vivo*. Como se describe en otro sitio en la presente, las composiciones para el uso en las aplicaciones diagnósticas son también descritas. En consecuencia, las composiciones de la presente invención pueden comprender, además de una o más de las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención, un excipiente, portador, tampón, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Tales materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir de manera significativa con la eficacia de los materiales en fase sólida para la aplicación en cuestión.

La naturaleza precisa del portador u otro componente puede estar relacionada a la manera o a la vía de administración de la composición. Estas composiciones pueden ser distribuidas por una gama de vías de administración incluyendo, pero no limitadas a: la administración gastrointestinal, especialmente la administración oral y nasogástrica; administración parenteral; incluyendo inyección; o mediante implante en sitios específicos, incluyendo prótesis que pueden ser utilizadas para este propósito o principalmente para otro propósito pero tienen este beneficio. En particular, las composiciones pueden ser utilizadas en transfección de genes o introducción de secuencias de ácido nucleico, en vacunación, distribución de agentes terapéuticos, manipulación *ex-vivo* de células para la re-inyección al mismo o a un diferente recipiente y la distribución de nutrientes. En particular, las composiciones pueden ser utilizadas en vacunación, y en el tratamiento o la prevención de trastornos autoinmunitarios, como parte de terapia contra el cáncer, tratamiento de alergias y/o intolerancias hacia alimentos, incluyendo la des-sensibilización, y el tratamiento o la prevención del trastorno inflamatorio del intestino, más especialmente la enfermedad de Crohn.

Como se describe en la presente, la presente invención proporciona los usos médicos en los cuales las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo son utilizadas para distribuir una amplia gama de sustancias terapéuticas, principalmente a las células presentes en el tracto gastrointestinal, tales como las células presentes en las placas de Peyer y en los nódulos linfáticos mesentéricos, en sitios tales como el íleon y las placas del ciego, especialmente el apéndice.

En una modalidad, la presente invención puede ser utilizada para el tratamiento o la prevención del cáncer, especialmente como composiciones de vacuna. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden ser utilizadas como vacunas para el tratamiento de Leucemias Mieloides. Estas pueden incluir el uso de moléculas de carga que son proteínas de fusión de BCR-ABL (Región de Cúmulo de Punto de Interrupción - Abelson) resultante de la formación del cromosoma Filadelfia en las Leucemias Mieloides, tales como la Leucemia Mielogénica Crónica (CML), Leucemia Linfoblástica Aguda y Leucemia Mielogénica Aguda (AML). Las proteínas de fusión de BCR-ABL, incluyendo porciones o análogos sintéticos de las mismas, pueden ser incorporadas dentro de las AMCP, y opcionalmente combinadas con un agente inmunoestimulador (rompimiento de tolerancia), tal como MAMP, para inducir respuestas de células T inmunitarias, adaptativas, robustas hacia las proteínas de fusión aberrantes del cáncer. Otro objetivo de proteína del cáncer que puede ser utilizado como una molécula de carga para la vacunación terapéutica es GAG-ONC (virus del sarcoma de Rous). Los detalles de estas proteínas están disponibles como sigue:

GAG-ONC:  
[http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2011/MB\\_cgi?mode=&term=gag-onc+Fusion+Proteins](http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2011/MB_cgi?mode=&term=gag-onc+Fusion+Proteins)

BCR-ABL:  
[http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2011/MB\\_cgi?mode=term+Fusion-Proteins,+bcr-abl&field=entry#TreeD12.776.602.500.500.100](http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2011/MB_cgi?mode=term+Fusion-Proteins,+bcr-abl&field=entry#TreeD12.776.602.500.500.100)

En una modalidad adicional, la presente invención puede ser utilizada para el tratamiento o la prevención de trastornos autoinmunitarios mediante el uso de la vacunación terapéutica para inducir tolerancia hacia las células T autoinmunitarias y las respuestas de auto-anticuerpo. La investigación previa utilizando el modelo murino de Encefalomiелitis Autoinmunitario experimental (EAE) para la esclerosis múltiple que la vacunación terapéutica contra los objetivos neuro-antigénicos autoinmunitarios, puede ser lograda vía la ruta oral (Song et al., The Peyer's patch is a critical immunoregulatory site for mucosal tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). J. Autoimmun. 2008 June; 30(4):230-7).

En una modalidad, las composiciones de la presente invención pueden ser utilizadas para el tratamiento o la prevención de la esclerosis múltiple por vacunación terapéutica, por ejemplo, mediante incorporación de una o más

proteínas neuro-antigénicas del sistema nervioso central, autoinmunitarias, dentro de AMCP, opcionalmente con uno o más agentes inductores de tolerancia, tales como el peptidoglicano, para inducir respuestas de células T tolerogénicas hacia los objetivos autoinmunitarios. A manera de ilustración las proteínas neuroantigénicas relacionadas específicamente al tratamiento de la esclerosis múltiple incluyen la Proteína Básica Mielina (MBP), Proteína Proteolipídica (PLP), Glucoproteína de Oligodendrocitos de Mielina (MOG), Glucoproteína asociada a la Mielina (MAG), Glucoproteína S100 $\beta$  (SB), Glucoproteína de Oligodendrocito-Mielina (OMGP), Proteína Básica Oligodendrocítica asociada a Mielina (MOBP),  $\alpha\beta$ -cristalina (CRAB) y la 3'-p-Fosfodiesterasa del nucleótido 2',3'-cíclico (CNP) (ver Crawford et al., High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. Blood 204 Jun 1;103(11):422-31). En consecuencia, una o más de estas proteínas, o un fragmento biológicamente activo de las mismas, pueden ser utilizadas como moléculas de carga.

En una modalidad adicional, la presente invención puede ser utilizada para el tratamiento o la prevención de trastornos inflamatorios del intestino, tales como la enfermedad de Crohn y la enfermedad celiaca. La vacunación terapéutica para el tratamiento o la prevención de trastornos inflamatorios del intestino, tales como la enfermedad celiaca puede ser llevada a cabo por la incorporación de Gliadina, una prolamina (proteína del gluten) encontrada en el trigo, o proteínas similares encontradas en las cosechas de la tribu *Triticeae* (tal como cebada y centeno) y AMCP con o sin agentes inductores de tolerancia (tales como peptidoglicano) para inducir respuestas de células T tolerogénicas hacia los objetivos autoinmunitarios. Ver Di Sabatino et al. (The Lancet - 25 April 2009 (Vol. 373, Issue 9673, Pages 1480-1493)

En una modalidad adicional, la presente invención puede ser utilizada para el tratamiento o la prevención de diabetes tipo 1. La vacunación terapéutica para el tratamiento o la prevención de diabetes tipo 1 puede ser llevada a cabo mediante la incorporación de la descaboxilasa del ácido glutámico (GAD) isoformas GAD67 y GAD65 dentro de AMCP, con o sin agentes inductores de tolerancia (tales como peptidoglicano) para inducir respuestas de células B tolerogénicas hacia los objetivos autoinmunitarios. Ver Kaufman Insulin-dependent diabetes mellitus. J. Clin. Invest., 1992;89 (1):283-292).

En una modalidad adicional, la presente invención puede ser utilizada para el tratamiento o la prevención de condiciones autoinmunitarias tales como el Lupus Eritematoso Sistémico (SLE). La vacunación terapéutica para el tratamiento o la prevención del SLE puede ser llevada a cabo mediante la incorporación de la caja 1 de Grupo de Alta Movilidad (HMGB1) y otras ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (objetivos comunes de nRNPs de los autoanticuerpos en el lupus y otros trastornos autoinmunitarios), dentro del AMCP con o sin agentes inductores de tolerancia (tales como el peptidoglicano) para inducir respuestas de células B tolerogénicas hacia los objetivos autoinmunitarios. Ver Poole et al., Early Targets of nRNP Humoral Autoimmunity in Human Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 2009 March; 60(3): 848-859.

En algunas modalidades, las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención pueden ser utilizadas para distribuir materiales de carga hacia tipos celulares o sitios biológicos que preferentemente los absorben. Estos incluyen las placas de Peyer y los nódulos linfáticos mesentéricos, presentes en sitios del tracto gastrointestinal tales como el íleon y las placas del ciego, especialmente el apéndice.

Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden estar en una forma de tableta, cápsula, polvo, gel, líquido, rocío de aspersión o un producto alimenticio adecuado. Una tableta puede incluir un portador sólido, tal como gelatina o un adyuvante. Las cápsulas pueden tener propiedades especializadas tales como un recubrimiento entérico. Las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen en general un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. La solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol, pueden ser incluidos. Donde las nanopartículas de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención necesitan ser mantenidas en una forma sólida, por ejemplo para controlar la distribución de un componente del material, puede ser necesario seleccionar los componentes de la formulación en consecuencia, por ejemplo, donde es elaborada una formulación líquida del material. Donde el material es administrado con un producto alimenticio, los componentes de la formulación serán elegidos para ser compatibles con las composiciones de nanopartículas de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo y para proporcionar características fisicoquímicas y organolépticas adecuadas.

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o la inyección en el sitio de la afectación, el ingrediente activo estará en la forma de una solución o suspensión acuosa, parenteralmente aceptable, la cual está libre de pirógenos, excepto porque está dentro de las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo, y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Aquellas personas de experiencia relevante en la técnica son muy capaces de preparar las soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Ringer Lactatado. Pueden ser incluidos, como se requiera, conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos.

Los materiales y composiciones utilizados de acuerdo con la presente invención que van a ser administrados a un individuo son preferentemente administrados en una "cantidad profilácticamente efectiva" o una "cantidad terapéuticamente efectiva" (como pueda ser el caso, aunque la profilaxis puede ser considerada terapia), siendo esto suficiente para mostrar el beneficio al estado clínico individual. La cantidad efectiva administrada, y la proporción y la

velocidad y el curso de tiempo de la administración, dependerán de la naturaleza y de la severidad de lo que esté siendo tratado. Las decisiones sobre la dosificación, etc., están dentro de la responsabilidad de los practicantes generales y otros médicos, y normalmente toma en cuenta el trastorno que va a ser tratado, la condición del paciente individual, el sitio de administración, el método de administración y otros factores conocidos para los practicantes. Los

- 5 ejemplos de las técnicas y los protocolos mencionados anteriormente pueden ser encontrados en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20<sup>va</sup> Edición, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins. Una composición puede ser administrada sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultáneamente o secuencialmente, dependiendo de la condición que va a ser tratada.
- 10 Los ejemplos de los usos de las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, los usos para la distribución de suplementos minerales dietéticos y
- 15 fortificantes; suplementos minerales terapéuticos (por ejemplo, como son administrados por las vías intravenosa y oral); fármacos, nutrientes o portadores/co-complejos cosméticos; agentes de enlace al fosfato; otras aplicaciones de enlace o de secuestro; aditivos alimenticios; antitranspirantes; agentes de protección solar; adyuvantes de composiciones de vacunas; agentes inmunomoduladores; aplicaciones cosméticas directas incluyendo agentes exfoliantes, rellenos/cementos dentales; materiales de implante incluyendo braquiterapia, y agentes de formación de imágenes y de contraste. En una modalidad, las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención pueden ser utilizadas como plataforma de distribución para suplementos para beneficio nutricional o médico. En una modalidad, la presente invención emplea nanopartículas como materiales de carga, por
- 20 ejemplo nanopartículas a base de metal o a base de oxo-hidróxido metálico. Estas pueden ser utilizadas para la formación de imágenes, por ejemplo para el rastreo del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo presente en un sujeto a quien ha sido administrada una composición de la presente invención. En todos los formatos, pero lo más especialmente para fortificantes, la formulación subsecuente, tal como la adición de un recubrimiento protector (por ejemplo lípido), puede ser necesaria para hacer al material compatible con su uso pretendido. Por ejemplo, las
- 25 composiciones pueden ser encapsuladas para la administración oral.

#### ***Papel de pd-l1 en la salud y enfermedad intestinal, en particular la enfermedad de crohn***

30 Las células presentadoras de antígeno (APCs) pueden adquirir antígenos proteicos solubles y/o en partículas, los cuales procesan y presentan polipéptidos, sobre su superficie, en el canal de las MHC. Las células T pueden entonces comprometer las MHC vía sus receptores de células T (TCR) formando un complejo MHC-antígeno-TCR. Precisamente cómo la célula T responde, depende de un número de factores, siendo uno importante las señales co-estimuladoras provenientes de otras moléculas superficiales.

- 35 En el tracto gastrointestinal, es sabido que una región importante del encuentro y presentación del antígeno proteico por las APCs hacia las células T son los folículos linfoides, ejemplificados por las placas de Peyer del íleon y las placas cecales del ciego, especialmente el apéndice. Se sabe que la respuesta general en el tracto gastrointestinal es una de la inmuno-tolerancia para prevenir las respuestas inmunitarias activas hacia todos los antígenos benéficos a los que está expuesto el intestino (por ejemplo, bacterias amigables que viven en el ambiente y proteínas alimenticias).
- 40 El ligando 1 de muerte programada (PD-L1), expresado sobre las células presentadoras de antígeno (APC), es una molécula co-estimuladora que en general proporciona señales de inmunotolerancia fuertes hacia las células T, y es una molécula candidata para ayudar a mantener la tolerancia en el tracto gastrointestinal. En un aspecto de la presente invención, los presentes inventores han encontrado que las células de las placas de Peyer que se tiñen con calceína debido a la presencia del nanomineral de fosfato de calcio endógeno, son representativas de las células receptoras de antígeno de los folículos linfoides intestinales, y normalmente expresan niveles distintos y principalmente altos de
- 45 PD-L1. Estas células son principalmente positivas a CD11b y CD11c, típicas de una población de células dendríticas en esta región del intestino, y una minoría son positivas a CD68, típicas de los macrófagos maduros. Tomadas conjuntamente, estas observaciones son consistentes con (a) la absorción y presentación del antígeno dentro de las células inmunitarias del folículo linfoide por las nanopartículas de fosfato de calcio y (b) PD-L1 que juega un papel
- 50 importante en estas células específicas para asegurar que el antígeno es presentado en un contexto tolerogénico.

Sorprendentemente, los inventores han encontrado ahora que en la enfermedad de Crohn, estas células son casi siempre negativas para PD-L1 o expresan niveles muy bajos. Esto sugiere que la falla de la señalización de PD-L1 en estas áreas, principalmente los folículos linfoides intestinales, es un defecto fundamental en la etiopatogénesis de la

55 enfermedad de Crohn que puede ser corregida para proporcionar beneficio terapéutico a los pacientes. En consecuencia, en un aspecto, la presente invención proporciona un agente capaz de incrementar la expresión de PD-L1 en las células inmunitarias presentadoras de antígeno, presentes en el intestino, para el uso en un método de tratamiento de la enfermedad de Crohn. En algunas modalidades, el agente puede ser distribuido a las células utilizando las nanopartículas de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo descritas en la presente, con lo cual se toma ventaja de su absorción selectiva por estas células.

60

A manera de explicación, el Ligando 1 de Muerte Celular Programada ("PD-L1") tiene un gen que codifica una proteína de 290 aminoácidos. En el PD-L1 principal, también conocido como CD274, pertenece a la superfamilia del B7:CD28 de las moléculas co-receptoras, y funciona como un inhibidor de la función de las células T al moderar la producción de citocina y la señalización de TCR cuando se enlaza a su receptor PD-1.

65

El Reporte de Símbolos Génicos HUGO (nombre del gen CD274; sinónimos B7H1, PDCD1L1, PDCD1LG1, PDL1 y algunas veces denominado como ligando 1) de PD-1) puede ser encontrado en [http://www.genenames.org/data/hgnc\\_data.php?hgnc\\_id=17635](http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=17635), la cual proporciona los vínculos para las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de PD-L1, así como la referencia a los homólogos murino y de rata. La secuencia de aminoácidos de PD-L1 humano de longitud completa es descrita en UniProt Knowledgebase en la SEQ ID NO: 1 (identificador: Q9NZQ7-1), aunque otras dos isoformas producidas por el empalme alternativo han sido descritas, las cuales difieren de la secuencia canónica como sigue: en la isoforma 2 los aminoácidos 19-132 están ausentes (identificador: Q9NZQ7-2), mientras que en la isoforma 3 existe un intercambio de aminoácido en la posición 178 (178-178: K → D) y los aminoácidos 179-290 están ausentes (identificador: Q9NZQ7-3).

```

10      MRIFAVFIEM TYWHLNNAFT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME
      DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAAIQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG
      ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDVPTSE HELTCQAEQY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT
      TTNSKREEKL FNVSTSLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEIIVPELP LAHPPNERTH
      LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET

```

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención está basada en los novedosos hallazgos que mediante tratamiento de estas células presentadoras de antígeno de los folículos linfoides intestinales, para aumentar la expresión de PD-L1, sería de beneficio terapéutico significativo en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Crohn. Los materiales de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención pueden imitar en nanomineral *in vivo*, podrían por lo tanto ser empleados para distribuir agentes capaces de aumentar la expresión de PD-L1 como el material de carga atrapado, teniendo la ventaja de dirigirse específicamente a las células de los folículos linfoides intestinales que requieren tratamiento. Tal terapéutica necesitaría desviar el “bloque de peptidoglicano” propuesto si ésta prueba ser la razón mecánica subyacente para la falla de la expresión de PD-L1 en la enfermedad de Crohn, o más bien los trastornos inflamatorios del intestino en general.

A manera de ejemplo, los agentes capaces de inducir PD-L1 son conocidos en la técnica. PD-L1 es inducido en células humanas por los interferones tipo 1, tales como IFN gamma (Seung-Jin Lee et al 2006 Dong et al 2002). Esta vía ha sido exitosamente manipulada para inducir o para suprimir la expresión de PD-L1 en células epiteliales biliares humanas, con el uso de la transfección del microARN-513: de las células epiteliales biliar con un oligonucleótido antisentido a la expresión de PD-L1 inducida por el miARN-513 (Gong et al 2009).

El análogo del dsARN viral, el ácido poliinosínico-policitidílico (poliIC), aumenta la expresión de B7-H1 vía la activación del factor nuclear κB(NF-κB) en células epiteliales (Keiko Kan-o et al 2013). De manera similar, las infecciones virales tales como el VIH están asociados al aumento viralmente inducido de PD-L1 sobre APC (Trabattoni et al 2003, Seyerl et al 2010).

También, las infecciones micobacterianas inducen la expresión de PD-L1 en APC (Sakai et al 2010). Esto puede ser realizado por la estimulación incluso con el producto proteico micobacteriano, tal como el derivado purificado proteico de tuberculina (PPD), dando como resultado el aumento de PD-L1 sobre APC, principalmente cuando la PPD estuvo presente en la forma de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo.

En algunos aspectos la presente invención se refiere a un agente que es capaz de uno o más de:

- (a) aumenta la expresión de PD-L1; o
- (b) activar la proteína PD-L1; o
- (c) inhibir la expresión de PD-L1; o
- (d) activar de otro modo PD-L1 sobre las células presentadoras de antígeno de los folículos linfoides intestinales, para el uso en un método de tratamiento de la enfermedad de Crohn, o trastorno inflamatorio del intestino en general.

En aspectos relacionados, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende tal agente, en donde el agente es atrapado como un material de carga dentro de un material de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo de la presente invención.

En un procedimiento, el tratamiento descrito en la presente puede emplear la terapia génica para inducir la expresión de PD-L1 en la célula diana u objetivo; la terapia génica es como se describe en otro sitio en la presente con detalle. En algunas modalidades, esto puede involucrar un material de carga que comprende el ácido nucleico que codifica PD-L1 que es incorporada en las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio sintético de la presente invención, para la distribución de las células objetivo con bajos niveles o ninguna expresión de PD-L1.

En general, los procedimientos de terapia génica de acuerdo a este aspecto de la presente invención emplearán el ácido nucleico que codifica el polipéptido PD-L1 biológicamente activo para tratar un paciente quien es incapaz de

sintetizar el polipéptido activo o es incapaz de sintetizarlo al nivel normal, con lo cual se proporciona el efecto provisto por PD-L1 de tipo silvestre y el tratamiento de la enfermedad de Crohn o la supresión de nuevos brotes de esta condición.

5 Los vectores tales como los vectores virales han sido utilizados en la técnica anterior para introducir genes dentro de una amplia variedad de diferentes células objetivo. Normalmente, los vectores son expuestos a las células objetivo de modo que la transfección puede tener lugar en una proporción suficiente de las células para proporcionar un efecto terapéutico o profiláctico útil a partir de la expresión del polipéptido. El ácido nucleico transfectado puede ser permanentemente incorporado dentro del genoma de cada una de las células objetivo, proporcionando efecto de larga duración, o alternativamente, el tratamiento puede tener que ser repetido periódicamente.

10 Varios vectores, tanto vectores virales como vectores plásmidos, son conocidos en la técnica, ver las Patentes de los Estados Unidos No. 5.252.479 y WO93/07282. En particular, han sido utilizados un número de virus como vectores de transferencia de genes, incluyendo los papovavirus, tales como SV40, el virus de la vaccinia, herpesvirus, 15 incluyendo HSV y EBV, y retrovirus. Muchos protocolos de terapia génica en la técnica anterior han utilizado retrovirus murinos deshabilitados.

20 Como una alternativa al uso de los vectores virales, otros métodos conocidos de introducción del ácido nucleico dentro de las células, incluyen electroporación, co-precipitación con fosfato de calcio, técnicas mecánicas tales como microinyección, transferencia mediada por liposomas y absorción directa de ADN y transferencia de ADN mediada por receptores. Además, la presente invención proporciona un medio adicional de distribuir las secuencias de ácido nucleico de PD-L1 a las células objetivo utilizando las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo descritas en la presente.

25 Como se mencionó anteriormente, el objetivo de la terapia génica utilizando el ácido nucleico que codifica para el polipéptido de PD-L1, o una porción activa del mismo, es incrementar la cantidad del producto de expresión del ácido nucleico en las células en las cuales el nivel del polipéptido de PD-L1 tipo silvestre está ausente, o presente únicamente a niveles reducidos.

30 En un segundo procedimiento, la terapia puede ser un agente que activa las regiones promotoras del gen de PD-L1 tal que éste es expresado como la proteína. En algunas modalidades, esto puede involucrar el agente que es utilizado como un material de carga incorporado en las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio, sintéticas de la presente invención. Los activadores de la expresión de PD-L1 pueden ser encontrados utilizando los métodos de cribado descritos en la presente.

35 En un tercer procedimiento, el tratamiento puede involucrar un MAMP ya que se sabe que estos inducen PD-L1. Los ejemplos de MAMP son dados en otro sitio en la presente. El peptidoglicano y los fragmentos de peptidoglicano, pueden o no ser MAMP útiles por las razones descritas anteriormente. En algunas modalidades, esto puede involucrar el MAMP que es utilizado como un material de carga incorporado en las composiciones de fosfato sintéticas de fosfato 40 de calcio sustituido con magnesio, de la presente invención.

45 En un cuarto procedimiento, el tratamiento puede involucrar un compuesto o mezcla de compuestos, en una forma soluble, coloidal, de nanopartícula o micropartícula, que inducen la expresión de PD-L1 tales como poli IC y los interferones u otras citocinas, especialmente interferones tipo I. En algunas modalidades, esto puede involucrar los compuestos que son utilizados como un material de carga incorporado en las composiciones sintéticas de fosfato de calcio sustituido con magnesio de la presente invención.

50 En un quinto procedimiento, el tratamiento puede involucrar un agente biológico que induce PD-L1, tal como un virus o bacteria, o una forma atenuada de los mismos, mezclas y/u homogeneizados de tales agentes biológicos tales como PPD o secuencias de ácido nucleico. En algunas modalidades, estos pueden involucrar el agente biológico que es utilizado como material de carga incorporado en las composiciones sintéticas de fosfato de calcio sustituido con magnesio, de la presente invención.

55 En un sexto procedimiento, el tratamiento puede involucrar un tratamiento para inhibir la represión de la expresión de PD-L1 en la enfermedad de Crohn, el tratamiento es opcionalmente la carga del fosfato de calcio sustituido con magnesio, sintético. En algunas modalidades, esto puede involucrar un agente capaz de inhibir la represión de la expresión de PD-L1 que es utilizada como un material de carga incorporado en las composiciones sintéticas de fosfato de calcio sustituido con magnesio, de la presente invención.

60 Será aparente para aquellos expertos en la técnica que estos procedimientos pueden ser empleados, solos o en cualquier combinación. Además, los procedimientos para activar PD-L1 pueden involucrar el uso de una o más quimiocinas o citocinas (por ejemplo, interferones), microARNs (por ejemplo, miR-513), péptidos, proteínas o glucoproteínas, anticuerpos, enzimas, oligonucleótidos y/o los siARNs o el ARNi.

65

**Métodos de cribado para los activadores de PD-L1**

La presente invención incluye los métodos de cribado para agentes capaces de incrementar la expresión de PD-L1 para el uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Crohn. Como se explica en la presente, se sabe que cuando PD-L1 está presente sobre las células presentadoras de antígeno, tales como las células dendríticas, éste actúa como un marcador que instruye a las células T a ser tolerantes al antígeno que es presentado por esa célula. Sin desear estar comprometidos por alguna teoría particular, los resultados en esta solicitud indican que los niveles reducidos o la no expresión de PD-L1 conduce a una falla para inducir esta tolerancia, y por lo tanto provoca la inflamación que es el punto crucial de la enfermedad de Crohn. Los presentes inventores creen que la expresión reducida de PD-L1 es un objetivo terapéutico para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Crohn, ya sea por la inducción de expresión de PD-L1 en las células presentadoras de antígeno que reciben el antígeno luminal. En una modalidad, este procedimiento puede utilizar las propiedades de las nanopartículas del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo en dirigirse a tales células en el intestino para distribuir agentes capaces de restaurar la función o la expresión de PD-L1.

Será bien conocido para aquellos expertos en la técnica que para evaluar si un agente terapéutico incrementa o no la expresión de moléculas co-estimuladoras, tal como la expresión de PD-L1, en los folículos linfoides intestinales, pueden ser tomados un número de procedimientos. Un procedimiento involucraría la resección o la toma de biopsia del agregado linfoide después del tratamiento, y la comparación de PD-L1 u otra expresión, tal como mediante inmunotinción de las secciones o ELISA o análisis de expresión de genes de las regiones o células extraídas del tejido tomado. Los resultados podrían ser comparados a los casos pseudo-tratados o tratados con placebo, o a las muestras tomadas en el valor inicial. En el caso de humanos, pueden ser utilizados colorantes de especialidad tal que los agregados linfoides intestinales son identificados mejor para fines de biopsia con endoscopia. Claramente, tales técnicas pueden ser aplicadas a pacientes con la enfermedad de Crohn.

En consecuencia, la presente invención también incluye los métodos para el cribado de los compuestos candidatos para encontrar activadores de PD-L1, por ejemplo, para identificar a los agentes candidatos que son capaces de activar la expresión de PD-L1 o la actividad de la proteína para el uso o desarrollo subsecuente como agentes para el tratamiento de trastorno inflamatorios del intestino, y en particular la enfermedad de Crohn. Convenientemente, esto puede ser realizado en un tampón de ensayo para ayudar a los componentes del ensayo a interactuar, y en un formato de pozos múltiples para probar una pluralidad de agentes candidatos. La actividad de PD-L1 puede ser entonces determinada en presencia o en ausencia de uno o más compuestos candidatos para determinar si un candidato dado tiene o no expresión incrementada de PD-L1 o bien niveles o actividad incrementados de la proteína PD-L1.

Para entender cuáles receptores son expresados que puedan ser acoplados en las células objetivo por una carga distribuida que aumenta PD-L1, pueden ser empleadas técnicas para buscar la expresión del receptor, incluyendo la inmunotinción y las medidas de la expresión de los genes. Después de esto, la carga adecuada que se acoplará al receptor y conducirá a la expresión de PD-L1, puede ser evaluada a través de estudios de cribado posteriores.

A manera de ejemplo, las moléculas de carga adecuadas para el uso en este aspecto de la presente invención pueden ser un activador conocido de PD-L1 o uno recién identificado. La tecnología de bibliotecas combinatorias proporciona una manera eficiente de probar un número potencialmente vasto de sustancias diferentes para la habilidad para modular la actividad de una proteína objetivo, tal como PD-L1. Tales bibliotecas y su uso son conocidos en la técnica. Después de la identificación de un agente candidato para la investigación posterior, el agente en cuestión puede ser probado para determinar si éste no es letal para las células normales o es de otro modo adecuado para el uso terapéutico. Después de estos estudios, y otros que confirman su elección para la terapia *in vivo*, el agente puede ser fabricado y/o utilizado en la preparación de un medicamento, composición farmacéutica o forma de dosis.

Los métodos de cribado para los activadores de PD-L1 puede emplear un ensayo basado en células, que comprende los pasos de poner en contacto las células que son capaces de expresar PD-L1 con uno o más agentes candidatos, y determinando si la expresión de PD-L1 o la actividad de la proteína se incrementa en respuesta a un agente candidato. El método puede comprender además la identificación del agente candidato que incrementa la expresión de PD-L1 o la actividad de la proteína. La presente solicitud identifica los tipos celulares y fenotipos adecuados para el uso en tales métodos de cribado. Es bien sabido en la técnica que a partir de la capa epitelial y en otro sitio en el intestino, son derivadas las señales que dotan a las células presentadoras de antígeno locales (APCs) con un fenotipo de inducción de tolerancia cuando ellas por sí mismas señalan (Iliev, 2009, 2009; Rimoldi, 2005; Maheshwari, 2011). Son conocidas las condiciones *in vitro* que pueden imitar este proceso. Es por lo tanto posible recoger células sanguíneas y utilizar un cóctel de sustancias químicas, o más bien los medios provenientes de cultivos de células epiteliales (el denominado medio condicionado de células epiteliales), e inducir este fenotipo promotor de tolerancia de las APCs (Mann et al., 2008; den Hartog et al., 2013; Zeuthen et al., 2008; Steinbrink, 1997). Es igualmente posible romper este proceso promotor de tolerancia de las APCs. Por ejemplo, con la adición de TNF alfa. Esto puede imitar el proceso en la enfermedad de Crohn (Bamias, 2013).

En un procedimiento, los agentes candidatos capaces de aumentar la regulación de PD-L1 pueden ser identificados a partir de la técnica anterior. Estos agentes pueden ser puestos en contacto con las APCs condicionadas, solos o como materiales de carga dentro de las composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio, de la presente

invención. Las células condicionadas estarán en presencia o en ausencia de TNF alfa y/u otros agentes rompedores de la tolerancia. La regulación de PD-L1 será evaluada, por ejemplo mediante Reacción en Cadena de Polimerasa de Transcriptasa Inversa (RT-PCR por sus siglas en Inglés) cuantitativa, para el aumento de genes y mediante tinción de anticuerpo con citometría de flujo para la proteína. Preferentemente, los agentes candidatos identificados como capaces de aumentar la expresión de PD-L1 serán capaces de hacerlo así a pesar del uso de agentes tales como TNF $\alpha$  para romper el proceso promotor de tolerancia de las APCs.

En un segundo procedimiento, puede ser llevado a cabo un método similar, pero con las APCs acondicionadas con el medio proveniente de cultivo de células epiteliales normales o con enfermedad de Crohn, siendo distribuidas estas células epiteliales a partir de biopsias endoscópicas o en cirugía. Preferentemente, los agentes candidatos identificados como capaces de aumentar la expresión de PD-L1, serán capaces de hacerlo así a pesar del uso de los medios condicionados por las células epiteliales con enfermedad de Crohn.

En un tercer procedimiento, existen numerosos modelos animales para la enfermedad de Crohn. Por ejemplo, ha sido descrito uno por Adolph et al, 2013. Diferentes modelos serán seleccionados por tinción de las secciones de placas de Peyer para la calceína y PD-L1. Los modelos con baja expresión similar de PD-L1 en las APCs de placas de Peyer positivas a la calceína, a aquella observada en la enfermedad de Crohn, serán utilizados para probar los agentes candidatos para la idoneidad como agentes terapéuticos. Estos podrían ser aplicados dentro o fuera de las composiciones sintéticas de fosfato de calcio sustituido con magnesio de la presente invención, y aplicados oralmente, con o sin recubrimiento entérico, o en perfusión o en experimentos de circuito cerrado o en experimentos quirúrgicos similares donde el agente terapéutico potencial está en contacto con las placas de Peyer por una o más horas. Las placas de Peyer pueden ser luego extirpadas en algún tiempo después de la aplicación del agente terapéutico potencial y a través de la tinción para la proteína y/o la hibridación *in situ* para el aumento de genes, el cambio en la expresión evaluada de PD-L1. Opcionalmente, las áreas de las placas o incluso las células simples disectadas, pueden ser evaluadas mediante citometría de flujo y/o técnicas de análisis de genes, como se describió anteriormente.

En un cuarto procedimiento, en pacientes con enfermedad de Crohn, los agentes terapéuticos potenciales, opcionalmente incorporados o no dentro del nanomineral sustituido con magnesio sintético, podrían ser aplicados oralmente o rectalmente, con recubrimiento entérico apropiado, como se requiera para permitir la liberación en el íleon y/o en el intestino grueso. El tratamiento podría ser aplicado por 1 día preferentemente de 3 días, y lo más preferiblemente 1 semana o más, y los agregados linfoides intestinales podrían ser extraídos por biopsia antes de o después del tratamiento y el cambio en la expresión de PD-L1 evaluado como se describe anteriormente.

Será claro para aquellos expertos en la técnica que todo o algo de los anteriores puede ser utilizado para identificar la terapéutica óptima que inducirá PD-L1 apropiadamente en las APCs de los folículos linfoides intestinales de pacientes con enfermedad de Crohn.

### **Experimental**

#### **Parte I: Descubrimiento del montaje endógeno de las nanopartículas de AMCP y el papel en el nanomineral Endógeno de las placas de Peyer de la luz intestinal**

Los contenidos del intestino delgado distal, recuperado de pacientes con ileostomía, fueron secados al aire sobre talones recubiertos con plástico para microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés). Números extensos de partícula de tamaño sub-micrónico fueron identificados y su composición elemental rica en fosfato de calcio fue confirmada mediante microanálisis de rayos X (XRMA por sus siglas en Inglés). La SEM de alta amplificación indicó que las partículas eran en general aglomerados de estructuras en nanopartículas, más pequeñas.

Para imitar mejor la dispersión *in situ*, secciones transversales completas de intestino delgado distal murino, incrustado en resina no acuosa, fueron luego estudiadas y se utilizó EM de transmisión (TEM) para proporcionar mayor resolución. Una alta densidad de nanopartículas relativamente densas en electrones fueron visibles y éstas fueron nuevamente ricas en calcio y fósforo mediante el análisis. La formación de imágenes TEM de alta energía mostró que estas partículas eran porosas y la difracción electrónica de área seleccionada confirmó que éstas no eran cristalinas, en contraste a la apatita biológica o al pentafosfato octacálcico que está más normalmente asociados a los sistemas biológicos.

#### **Las células M de las placas de Peyer transportan el nanomineral endógeno**

Para determinar si estos nanominerales endógenamente formados de la luz intestinal eran transportados por las células M del epitelio de las placas de Peyer, se llevó a cabo el análisis TEM de secciones delgadas derivadas de ratón. Se utilizó resina no acuosa para preservar la estructura de las partículas *in situ*, mientras que las células M fueron identificadas por sus micro-vellos superficiales mal desarrollados, bien descritos, o la falta de los mismos, en contraste a los enterocitos vecinos. Con esta estrategia, numerosas estructuras nanominerales dispersas dentro de las células M fueron identificadas con tamaño, forma, estructura amorfa y composición elemental de rayos X idénticas a aquellas caracterizadas en la luz intestinal. En ocasiones raras, una o dos de tales partículas en la interfaz célula M-enterocito fueron observadas, pero no se encontró evidencia de estas partículas dentro de los enterocitos regulares;

más bien, éstas parecieron estar restringidas a, y en abundancia, dentro de las células con características típicas de células M.

#### ***Mineral endógeno en células presentadoras de antígeno de las placas de Peyer***

Las células M parecen tener poca capacidad para el procesamiento de antígenos pero, en vez de esto, pasan sobre las moléculas lumbinales a las células inmunitarias subyacentes. Aunque se identificó mediante TEM que el nanomineral endógeno está dentro de las células M de una manera dispersa, los cúmulos de nanopartículas pueden ser observados mediante microscopía de luz cuando se acumulan en los compartimientos vesiculares (por ejemplo, lisosomales) de las APCs. De este modo, secciones congeladas de placas de Peyer humanas y murinas fueron estudiadas, y la tinción de Von Kossa modificada para fosfato mineralizado, reveló grandes números de células positivas dentro del domo sub-epitelial más profundo. La tinción con calceína fluorescente, para el calcio mineralizado, confirmó estas observaciones. Un detector para electrones retrodispersos ajustado al SEM permitió la identificación de las regiones densas en electrones en la misma área del domo sub-epitelial que fueron, nuevamente, ricas en calcio y en fósforo mediante micro-análisis de rayos X. Muestras de tejido humano y murino fueron similarmente positivas para estas características.

Se utilizaron marcadores fluorescentes comunes basados en anticuerpo para confirmar un fenotipo APC de estas células positivas a los minerales en las placas de Peyer murinas y humanas. Ya que puede ocurrir la tinción del antígeno celular artefactual con estas células, presumiblemente a través de la adsorción del colorante hacia el mineral intracelular, se debe tener cuidado en asegurarse que, para la fenotipificación, todas las tinciones mostraron distribuciones celulares típicas de la localización anticipada del antígeno y no simplemente co-incidental con las áreas celulares ricas en mineral. Además de la tinción nuclear, la doble tinción, específicamente la calceína para mineral más un marcador fenotípico, se utilizó al mismo tiempo. La mayoría de las células humanas y murinas positivas a la calceína fueron fuertemente positivas para CD11b, CD11c y HLA-DR con una sub-población distinta que fueron CD68<sup>hi</sup>). El marcador monocito (periférico), CD14, estuvo ausente mientras que éste y los antígenos positivos anteriormente anotados fueron todos confirmados en tejidos control positivo específicos que contenían células que expresan estos marcadores (ver Métodos). De este modo, en general, el fenotipo de las células positivas al mineral del domo sub-epitelial de las placas de Peyer, fue consistente con la APC mononuclear que reside en esa zona.

Las vesículas intracelulares individuales, que contenían el mineral positivo a la calceína pudieron ser discernidas dentro de las APCs del domo sub-epitelial. En esta región, la formación de la imagen TEM de secciones delgadas incrustadas en resina no acuosa, demostró una morfología nanomineral individual, idéntica a las partículas de células M lumbinales y epiteliales. Las similitudes mediante la formación de imágenes fueron confirmadas analíticamente para el contenido de calcio, magnesio y fósforo, utilizando cuantificación estándar menos elemental de los espectros de microanálisis de rayos X a partir de secciones delgadas similares de las placas de Peyer y los contenidos lumbinales.

#### ***Caracterización por TEM de barrido in situ (STEM) y nanotomografía tridimensional***

Los cúmulos del calcio mineralizado en nanopartículas fueron frecuentemente observados en las APCs del domo sub-epitelial, quizás explicado por la adhesión a las membranas vesículas internas, que es bien conocido para los nanominerales en los lisosomas celulares. Una región proveniente de tal cúmulo fue formada en imagen utilizando STEM de campo oscuro anular de ángulo alto (HAADF por sus siglas en inglés) para hacer posible un contraste suficiente con los especímenes no teñidos incrustados en resina no acuosa. La serie de inclinación de HAADF-STEM fue registrada y utilizada para reconstruir un modelo tridimensional.

#### ***El nanomineral endógeno atrapa y transporta fragmentos bacterianos lumbinales y el antígeno de la dieta***

La formación homogénea de nanomineral de fosfato de calcio a través de las células M dentro de las APCs de las placas de Peyer, nos condujo a cuestionar la función. Los fosfatos de calcio sobresalen en el atrapamiento de moléculas orgánicas y, bajo ciertas circunstancias, entran a las células con su material enlazado. Aquí, por lo tanto, una función constitutiva de "nave de carga" del nanomineral endógeno fue considerada, con lo cual las moléculas orgánicas lumbinales, solubles pudieron ser atrapadas y luego transportadas hacia las APCs intestinales. Para probar si el antígeno proteico de la dieta, oralmente distribuido puede o no atravesar el epitelio de las placas de Peyer, asociado al nanomineral formado endógenamente, ratones BALB/c fueron alimentados con ovoalbúmina marcada con Texas Red<sup>®</sup>. La proteína detectada en las placas de Peyer fue casi únicamente compartimentalizada con las células positivas al nanomineral del domo sub-epitelial. Ya que siguió siendo posible que la ovoalbúmina y el fluorocromo fueran escindidos durante la digestión, únicamente el último que está asociado al nanomineral, las secciones de las placas de Peyer para la ovoalbúmina fueron también directamente teñidas. Utilizando el algoritmo de desconvolución mínimo esperado, de Huygens, para elevar al máximo la resolución con microscopía confocal, fue nuevamente observada la co-localización clara. Adicionalmente, existieron señales de calceína y proteína extra celulares, cercanas pero separadas, como podría haber sido esperado si el nanomineral se disuelve intra-lisosomalmente, desenmascarándose primero, y luego liberando su carga.

Los MAMP, tales como el peptidoglicano, están presentes de manera ubicua en la luz del tracto gastrointestinal distal, incluyendo el íleon, debido a la conversión de la flora bacteriana comensal. El peptidoglicano ha sido identificado en

aspectos apicales humanos y murinos de la mucosa intestinal por el anticuerpo 2E9, el cual reconoce únicamente el peptidoglicano degradado/libre y no aquel presente en las bacterias completas. Los experimentos que utilizan el anticuerpo 2E9 mostraron que, de manera similar a la ovoalbúmina derivada de la dieta, el peptidoglicano fue compartimentalizado con el nanomineral de las APCs, nuevamente en términos de señales fluorescentes inseparables, y también como señales separadas pero estrechamente adyacentes. Se confirmó que, justo como para las placas de Peyer, el nanomineral de AMCP fue también observado en las células inmunitarias sub-epiteliales de las placas del ciego. Colectivamente, estos datos indican que el nanomineral de AMCP intestinal, endógeno se forma en la luz y entra a las APCs de los sitios inmuno-inductores intestinales, específicamente las placas del ciego y de Peyer, predominantemente vía las células M epiteliales, ver figura 11A. La respuesta inmunitaria intestinal hacia la proteína oralmente distribuida, involucra la cooperación entre las placas de Peyer y los nódulos linfáticos mesentéricos. En particular, la migración de las APCs hacia los nódulos linfáticos mesentéricos implica actividad funcional (es decir presentación de antígeno) y confirmamos que los nódulos linfáticos mesentéricos en ratones tuvieron un número significativo de células positivas a nanominerales y AMCP (figura 11B).

## 15 **Discusión**

Aunque la enumeración de partículas nanominerales endógenas en la luz gastrointestinal humana excede la capacidad analítica actual, estas observaciones sobre los contenidos del intestino delgado de humanos y murinos sugieren que éstas aparecen en números enormes. Por ejemplo, si la [Ca] y [P] mediana son 4,2 mM y 10 nM respectivamente, en 1/24h de jugo intestinal (*succus entericus*) del íleon humano, y un tercer precipitado a una proporción molar media de 6:10 (P:(Ca+Mg) ya que el Mg sustituye al Ca) para formar, en promedio, partículas amorfas, esféricas del 100 nm de diámetro (con la densidad de empaquetamiento de fósforo similar a aquella en el fosfato octacálcico) con un volumen vacío del 50 % (porosidad) entonces se estima que aproximadamente  $2 \times 10^{14}$  partículas estarán presentes. Es probable que este nanomineral no haya sido previamente observado/caracterizado debido a que las partículas son pequeñas y las técnicas de procesamiento para el análisis deben ser cuidadosamente controladas para evitar la degradación acuosa.

Existen varias características notables e inusuales para este nanomineral. Primeramente, éste permanece como nanopartículas discretas (dispersas), auto-ensambladas. Mientras que la formación de los nanominerales endógenos es bien conocida (por ejemplo, ferrihidrita en el núcleo de la molécula de ferritina, o la apatita biológica como la estructura de cristalito primaria del hueso) éstas son recubiertas en plantilla por sustratos orgánicos. En contraste, la mineralización auto-ensamblada ectópica involucra normalmente la precipitación y agregación no controladas de las partículas. En segundo lugar, el producto de actividad iónica mínima requerido para formar el fosfato de calcio amorfo, en preferencia a los fosfatos de calcio más cristalinos, es en general demasiado alto *in vivo*, y así pues el fosfato de calcio amorfo biológico es raro. En humanos, la evidencia para la aparición de fosfato de calcio amorfo en el hueso, por ejemplo, es pobre, aunque éste puede jugar un papel transitorio en el inicio de la biomineralización de las vesículas de matriz. Incluso entonces, el fosfato de calcio amorfo, que es al menos estable de las fases de fosfato de calcio, se convierte rápidamente a fosfato octacálcico y más adelante a estructuras tipo apatita. En el intestino, no obstante, el nanomineral de fosfato de calcio parece estable en forma amorfa desde la luz justo a través de la distribución hacia las células inmunitarias mucosales, y es presumiblemente enlazado por el contenido relativamente alto de magnesio y la carga orgánica substancial. De manera importante, como la forma más fácilmente soluble del fosfato de calcio, las condiciones lisosomales permitirían la disolución rápida del nanomineral endógeno y la liberación de la carga orgánica derivada de la luz intestinal. Por supuesto, una tercera propiedad única de estos nanominerales endógenamente formados, es su extensa porosidad y su capacidad funcional notable, para atrapar las moléculas lumbales y distribuir las hacia las APCs de las placas de Peyer vía el portal de células M.

Estos experimentos identificaron el peptidoglicano y el antígeno proteico de la dieta como dos objetivos para el atrapamiento y la distribución a las células inmunitarias por las nanopartículas de fosfato de calcio amorfas, y otras moléculas pudieron ser similarmente empleadas como moléculas de carga, y por ejemplo ser acompañadas hacia las APCs de las placas de Peyer. El sistema inmunitario gastrointestinal tiene un arreglo aparente de mecanismos para muestrear el material luminal y generar respuestas inmunitarias apropiadas (tolerogénicas por omisión). Este trabajo muestra que las nanopartículas amorfas de fosfato de calcio que atrapan moléculas de carga tales como los antígenos lumbales y los patrones moleculares asociados a los microbios (MAMP), con distribución a través de las células M hacia las APCs sub-epiteliales, pueden formar una parte importante de la supervisión inmunitaria del intestino y la red de tolerancia del mismo. Por su puesto, la red enzimática en el límite del cepillo puede destruir las MAMP libres o adsorbidas en partículas y los antígenos, de modo que únicamente las moléculas orgánicas incorporadas en el nanomineral pueden atravesar de manera segura la mucosa apical de las placas de Peyer hacia las células inmunitarias subyacentes.

En general, estos aspectos de la presente invención proporcionan nuevas introspectivas hacia la interacción entre la nutrición, la fisiología intestinal y el sistema inmunitario mucosal, mediado por las nanopartículas endógenas auto-ensambladas. En particular, estos sugieren respuestas para (a) por qué la placa de Peyer tiene tal habilidad notable para la absorción de nanopartículas no biológicas en el intervalo de aproximadamente 20 a 250 nm, (b) cómo, bajo condiciones constitutivas, el antígeno luminal y las MAMP pueden alcanzar las APCs del domo sub-epitelial más profundo sin degradación enzimática previa, o sin comprometer respuestas epiteliales, (c) por qué existen pérdidas de calcio endógenas "obligatorias" hacia la luz intestinal.

**Parte II: El desarrollo de miméticos sintéticos de las nanopartículas de ACP, su caracterización y uso como portadores de carga**

5 Con base en los hallazgos anteriores en la Parte I que en el tracto gastrointestinal, los iones calcio y iones fosfato se precipitan y forman nanopartículas que atrapan moléculas orgánicas presentes en la luz para la distribución hacia las células inmunitarias mucosales del intestino, los presentes inventores llevaron a cabo experimentos para producir miméticos sintéticos de nanopartículas de fosfato de calcio intestinales, endógenas, y para determinar si éstas son estables y capaces de actuar como portadores de las moléculas de carga.

10 **Ejemplo 1: Síntesis de las partículas de fosfato de calcio amorfo (amcp)**

15 Las partículas de fosfato de calcio amorfo, sintéticas ("ACP") fueron preparadas utilizando un protocolo modificado de Boskey y Posner (Boskey y Posner, 1974). La modificación consistió de la adición del magnesio ( $Mg^{2+}$ ) y/o al llevar a cabo la síntesis en presencia de una gama de moléculas capaces de llegar a atraparse dentro de las partículas de AMCP para aumentar la estabilidad de fase. El proceso de síntesis para las partículas de AMCP cargadas y no cargadas, estuvo basado en la adición rápida de una solución de fosfato ( $PO_4$ ) a una solución de calcio ambas amortiguadas a pH alcalino (normalmente pH 8 o 9 y amortiguado con Tris). Inicialmente, una fase de fosfato de calcio amorfo (ACP) es formada, la cual tiende a convertirse a fases más cristalinas. El proceso de conversión puede ser prevenido, o al menos inhibido, por la adición de los iones  $Mg^{2+}$  y/o al llevar a cabo la síntesis en presencia de una amplia gama de moléculas capaces de llegar a atraparse dentro de las partículas de AMCP.

20 A manera de ilustración, 18,1 g de  $C_4H_{11}NO_3$  con base de Trizma, se disolvieron en 1 litro de agua ultra pura para hacer una solución de 0,15M de tampón de Tris. El pH fue ajustado a pH 8 mediante la adición gota a gota de ácido clorhídrico (TRIS-HCl). La solución A fue preparada mediante la adición de 2,6 g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  a 500 mililitros de tampón de TRIS-HCl que contenía 0,73 gramos de  $MgCl_2 \cdot 2H_2O$  y el pH ajustado a pH 8. La solución B fue preparada mediante la adición de 2,6 g de  $(NH_4)_2HPO_4$  a 500 ml de tampón de TRIS-HCl y el pH fue ajustado a pH 8. Cantidades iguales de la solución A y la solución B fueron luego mezcladas entre sí (v/v) y rotadas por una hora a temperatura ambiente. Después de una hora, las partículas resultantes fueron lavadas dos veces en agua a pH 10 y una vez en acetona. Las partículas fueron luego secadas toda la noche a 50 °C y pesadas. En promedio se recuperaron 2,19 mg  $\pm$  0,14 (n = 4) de polvo de AMCP seco, por ml de preparación de partículas.

25 **Ejemplo 2: Síntesis de las partículas de fosfato de calcio amorfo (amcp) que contienen una proteína**

35 Las partículas de ACP fueron preparadas como se describe en el Ejemplo 1, con la modificación de que la proteína, como es ejemplificada por la albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en Inglés) o la avidina fue agregada a la solución A para producir 1 mg/ml. Cantidades iguales de la solución A y B fueron luego mezcladas conjuntamente (v/v) y rotadas por 1 hora a temperatura ambiente. Después de una hora, las partículas resultantes fueron lavadas dos veces en agua en pH 10 y la pelotilla resultante de partículas disueltas en el tampón de ácido cítrico (10 nM, pH 3). El nivel de proteína incorporada dentro de las partículas fue medido por el ensayo de proteína Bradford. En ocasiones, las partículas fueron también secadas toda la noche a 50 °C y los polvos pesados (n = 4, después de dos lavados en acetona). En promedio, estuvieron presentes 242,9  $\mu g \pm$  47,77 (n = 8) de BSA o 157,76  $\mu g$  de avidina (n = 1) en 2,39 mg  $\pm$  0,14 mg de polvo de ACP (n = 4).

40 **Ejemplo 3: Síntesis de fosfato de calcio amorfo (amcp) partículas que contienen una proteína y una porción bacteriana cruda**

45 Las partículas AMCP fueron preparadas como se describe en el Ejemplo 1 con la modificación de que el BSA y el peptidoglicano crudo teñido (azul brillante de Remazol; Zhou et al, 1988) proveniente de *S. aureus* fueron agregados a la solución A para producir 1 mg/ml y 100  $\mu g/ml$ , respectivamente. Cantidades iguales de solución A y B fueron luego mezcladas entre sí v/v y rotadas por 1 hora a temperatura ambiente. Después de 1 hora, las partículas resultantes fueron lavadas dos veces en agua en pH 10. La pelotilla resultante de partículas fue disuelta en tampón de ácido cítrico para fines de cuantificación y se midió el nivel de proteína incorporada dentro de las partículas mediante el ensayo de proteína de Bradford, mientras que la cantidad del peptidoglicano teñido fue leída a 595 nm. En promedio estuvieron presentes 270,5  $\mu g \pm$  13,95  $\mu g$  (n = 3) de BSA y 45,20  $\pm$  0,99  $\mu g$  (n = 4) de Pg crudo en 1,98 mg de polvo de ACP (n = 1).

50 **Ejemplo 4: Síntesis de partículas de fosfato de calcio amorfo (amcp) que contienen una proteína y la porción bacteriana soluble**

60 Las partículas de AMCP fueron preparadas como se describe en el ejemplo 1, con la modificación de que el BSA y peptidoglicano solubles provenientes de *E. Coli* fueron agregados a la solución A para producir 1 mg/ml y 100  $\mu g/ml$ , respectivamente. Cantidades iguales de la solución A y B fueron luego mezcladas entre sí (v/v) y rotadas por una hora a temperatura ambiente. Después de una hora, las partículas resultantes fueron lavadas dos veces en pH 10. Las pelotillas resultantes de las partículas fueron disueltas en tampón de ácido cítrico para fines de cuantificación y se midió el nivel de proteína incorporada dentro de las partículas mediante el ensayo de proteína de Bradford mientras que la cantidad del peptidoglicano soluble fue evaluada mediante el ensayo de Schiff Peryódico Adaptado

(Jugdohsingh R, 1999). En promedio estuvieron presentes  $232,9 \mu\text{g} \pm 14,62 \mu\text{g}$  ( $n = 5$ ) de BSA y  $29,47 \pm 12,83 \mu\text{g}$  ( $n = 9$ ) de Pg soluble en las partículas de AMCP.

**Ejemplo 5: Síntesis de las partículas de fosfato de calcio amorfo (amcp) que contienen una proteína y un polisacárido complejo soluble**

Las partículas de AMCP fueron preparadas como se describe en el Ejemplo 1, con la modificación de que BSA y almidón soluble fueron agregados a la solución A para producir 1 mg/ml y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectivamente. Cantidades iguales de la solución A y B fueron luego mezcladas entre sí (v/v) y rotadas por una hora a temperatura ambiente. Después de una hora, las partículas resultantes fueron lavadas dos veces en pH 10. La pelotilla resultante de las partículas fue disuelta en tampón de ácido cítrico para fines de cuantificación, y la cantidad de almidón soluble incorporado dentro de las partículas fue evaluada mediante el ensayo de Schiff Peryódico Adaptado (Jugdohsingh R, 1999) y se encontró que era de  $45,99 \mu\text{g}$  ( $n = 1$ ).

**Ejemplo 6: Síntesis de las partículas de fosfato de calcio amorfo (amcp) que contienen una proteína y un inmunógeno**

Las partículas de AMCP fueron preparadas como se describe en el Ejemplo 1, con la modificación de que se agregó BSA a la solución A para producir 1 mg/ml mientras que fueron agregados los Derivados Purificados Proteicos (PPD de M. tuberculosis) a la solución B y para producir 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Cantidades iguales de la solución A y B fueron luego mezcladas entre sí (v/v) y rotadas por una hora a temperatura ambiente. Después de una hora, las partículas resultantes fueron lavadas dos veces en pH 10. La pelotilla resultante de las partículas fue disuelta en tampón de ácido cítrico para fines de cuantificación. Los niveles de proteínas incorporadas dentro de las partículas fueron medidos mediante el ensayo de proteína de Bradford y mediante el ensayo PAS. En promedio estuvieron presentes  $188,9 \mu\text{g} \pm 24,54 \mu\text{g}$  ( $n = 4$ ) de BSA y  $51,61 \pm 20,07 \mu\text{g}$  ( $n = 3$ ) de PPD en las partículas de ACP.

**Ejemplo 7: Síntesis de las partículas de fosfato de calcio amorfo (amcp) que contienen proteína y una citocina**

Las partículas de AMCP fueron preparadas como se describe en el Ejemplo 1, con la modificación de que se agregó BSA a la solución A para producir 1 mg/ml mientras que se agregó la Linfopoyetina Estrómic Tímica (TSLP) a la solución B para producir 100 o 1 mg/ml. Cantidades iguales de las soluciones A y B fueron luego mezcladas entre sí (v/v) y rotadas por una hora a temperatura ambiente. Después de una hora, las partículas resultantes fueron lavadas dos veces en agua de pH 10. La pelotilla resultante de las partículas fue disuelta en tampón de ácido cítrico para fines de cuantificación y se midió el nivel de TSLP incorporado dentro de las partículas, mediante una ELISA específica para TSLP y se encontró que era de 1,38 ng ( $n = 1$ ) y 25,73 pg ( $n = 1$ ), respectivamente.

**Ejemplo 8: Síntesis de las partículas de fosfato de calcio amorfo (amcp) que contienen partículas que contienen óxido de hierro, y proteína o "amcp/bsa/fe"**

Las partículas de AMCP fueron preparadas como se describe en el Ejemplo 2, con la modificación que la solución de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}/\text{BSA}$  fue adicionalmente mezclada con 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de solución de óxido de hierro. La solución resultante fue luego mezclada con un volumen igual de solución de  $\text{PO}_4$  para permitir la precipitación de las partículas.

**Caracterización estructural de las partículas de fosfato de calcio sintéticas**

Partículas de fosfato de calcio sintéticas preparadas en ausencia (es decir, AMCP/BSA) o presencia de pequeñas nanopartículas de óxido de hierro (es decir AMCP/BSA/Fe) fueron fijadas en la resina no acuosa "Quetol 651" y se cortaron secciones hasta 70 nm de espesor. Los experimentos de tomografía basados en formación de imágenes en campo oscuro anular de alto ángulo (HAADF) en el modo de microscopio electrónico de transmisión de barrido (STEM) fueron realizados a 200kV sobre un microscopio electrónico FEI Tecnai F20, inclinando la muestra desde  $-42^\circ$  hasta  $+70^\circ$  a intervalos de  $2^\circ$  alrededor de un eje simple utilizando un portador de tomografía de inclinación ultra alta Fischione 2020. Las series de inclinación fueron alineadas y reconstruidas utilizando el software Inspect3D y el software AMIRA fue utilizado para la visualización.

**Cuantificación de la fracción orgánica contenida dentro de las partículas sintéticas de fosfato de calcio**

Después de la síntesis, las partículas que contenían moléculas de carga tales como BSA o sPG (solas o en conjunto) fueron centrifugadas a 1,500 rpm (5 min) y los sobrenadantes fueron recolectados. Enseguida, las partículas fueron lavadas dos veces en agua en pH 10. Posteriormente, para fines de cuantificación, las partículas fueron disueltas en tampón de ácido cítrico 100 nM (pH 3) para liberar el material orgánico. El contenido de proteína total fue medido utilizando el ensayo de proteína Bradford (de acuerdo al protocolo del fabricante Bio-Rad Laboratories, Reino Unido) mientras que el material de Pg fue cuantificado utilizando un ensayo modificado de Schiff de Ácido Peryódico (PAS; Jugdohsingh R et al, 1999). Este ensayo confía en la formación de un complejo de color púrpura cuya absorbancia es proporcional a la cantidad de polisacáridos en solución. Las muestras y los estándares (100  $\mu\text{l}$ ) fueron primeramente incubados con peryodato de sodio 92 nM en ácido sulfúrico 0,5 M (10  $\mu\text{l}/\text{pozo}$ ,  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos, con agitación

ocasional) y luego con arsenito de sodio al 2,7 % en HCl 0,68 M (20  $\mu$ l/pozo) a temperatura ambiente sobre un agitador de placas (40 minutos). Después de la adición del reactivo de Schiff (50  $\mu$ l/pozo: Merch KGaA, Alemania) y 30 minutos adicionales de incubación a 37 °C, la placa fue leída a 540 nm. La concentración de los polisacáridos fue determinada contra una curva estándar de Pg soluble (0-250  $\mu$ g/ml) y preparada en el lisado de partículas de AMCP/BSA para explicar la matriz de la muestra.

### **Medición por tamaño**

Se realizó el Análisis de Rastreo de Nanopartículas sobre un Aparato Nanosight NS500 (Nanosight Amesbury, Reino Unido) utilizando el Software Analítico NTA2.2. Para cada experimento las muestras fueron medidas en triplicados técnicos (90 segundos cada una) y los resultados fueron promediados. Los datos son mostrados como la media de tres experimentos independientes.

### **Determinación de la composición elemental**

Las partículas sintéticas de fosfato de calcio fueron disueltas en HNO<sub>3</sub> al 5 % (Sigma-Aldrich Company Ltd. Dorset, Reino Unido) antes del análisis ICP-OES. Las muestras fueron analizadas utilizando el equipo JY2000 ICP-OES (Horiba Jobin Yvon Ltd. Stanmore, Reino Unido) y el calcio y el fósforo fueron detectados a 396,847 nm y 177,440 nm, respectivamente. La cuantificación fue realizada utilizando estándares externos (Soluciones estándares de Calibración a 1000 ppm, Fisher Scientific UK Ltd, Leicestershire, Reino Unido; 0,5-50 ppm). El calcio y fósforo totales fueron obtenidos a partir de las suspensiones de partículas recolectadas después de la síntesis o después de la dilución en TCM mientras que las alícuotas de las suspensiones de partículas fueron ultra filtradas (MWCO 3 KDa, 10 minutos, 12,000 rpm) para determinar las fracciones solubles de calcio y fósforo. La corrección antecedente fue realizada utilizando los valores de calcio y fósforo obtenidos a partir de D10 (es decir, el TCM) que habían sido sometidas al mismo tratamiento que las suspensiones de partículas. La fracción elemental de partículas fue luego calculada como la diferencia entre la composición elemental total y soluble.

### **Aislamiento de células**

Conos de leucocitos (n = 7) fueron adquiridos de National Blood Service, Cambridge, Reino Unido, y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron aisladas mediante centrifugación por densidad con Lymphoprep (Axix Shield Diagnostics Ltd, Dundee, Escocia) como el medio de separación. En resumen, la sangre fue diluida con HBSS (Sigma-Aldrich) y 25 ml de sangre diluida, cuidadosamente colocada en capas sobre 10 ml de Lymphoprep. Después de 20 minutos de centrifugación (800 x g, frenado) la capa resultante de las células mononucleares fue recolectada, lavada tres veces en HBSS, y luego re-suspendida en R10 (medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), suplementado con suero fetal de ternera al 10 %, inactivado por calor (PAA Laboratories Ltd, Dorset, Reino Unido), 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina, y L-glutamina 2 mM (todos de Sigma-Aldrich) a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/mililitro para el enriquecimiento posterior de los monocitos.

Para este fin, se realizó una segunda centrifugación por densidad como es descrito por Martínez. En resumen, el medio de densidad Percoll (Sigma-Aldrich) fue osmolarizado a 285 mOsm al mezclar 9,25 partes de Percoll con 0,75 partes de DPBS 10x (con calcio y magnesio; Sigma-Aldrich) y luego fue diluida a 46 % (v/v) en R10. La suspensión de PBMC fue cuidadosamente colocada en capas sobre un volumen igual de solución al 46 % de Percoll 285 mOsm. Después de 30 min de centrifugación (400 x g, frenado), la capa resultante de PBMC enriquecida en monocitos fue recolectada, lavada tres veces en HBSS y finalmente re-suspendida a  $1 \times 10^6$  células/ml en R10. Las PBMC enriquecidas en monocitos mostraron rutinariamente una viabilidad de  $\geq 95$  % como es determinado por el ensayo de exclusión con azul de tripan (Sigma-Aldrich) (y consistió de 57,29 % de monocitos CD14+ medido mediante citometría de flujo).

### **Estimulación celular**

El cultivo y la estimulación de las PBMC enriquecidas en monocitos, fueron realizados en tubos Falcon estériles de 15 ml (Starlab UK Ltd, Milton Keynes, Reino Unido) a  $1 \times 10^6$  células/ml y a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub>. Las PBMC enriquecidas en monocitos, recién aisladas, fueron sometidas a reposo toda la noche, después de lo cual éstas fueron reabastecidas con el medio de cultivo de tejido fresco (específicamente D10: DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado con 10 % de suero inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomina, y L-glutamina 2 mM).  $5 \times 10^6$  células fueron luego estimuladas por 3 horas con el vehículo D10 como control negativo, o con 4,4  $\mu$ g/ml de peptidoglicano soluble (de Escherichia coli., Source BioScience plc, Nottingham, Reino Unido) ya sea en la forma soluble (sPg) o en partículas (AMCP/BSA/sPg). Esto fue logrado mediante la preparación de 40  $\mu$ g/ml de sPg en D10, o sintetizando las partículas de AMCP/BSA/sPg con 50  $\mu$ g/ml de sPg (para explicar las pérdidas de sPg durante los lavados de las partículas), y agregando 125  $\mu$ l del estimulante por ml de suspensión celular. Después de 3 horas los estimulantes fueron retirados y las células lavadas dos veces en HBSS antes de que éstas fueran lisadas con Solución de Purificación de Ácido Nucleico (Life Technologies Ltd, Paisley Reino Unido) y los lisados celulares almacenados a -80 °C antes del aislamiento del ARN.

**Extracción del ARN**

El ARN total fue purificado utilizando un equipo PrepStation de Ácido Nucleico Abi Prism 6100 (Applied Biosystems, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante, e incluyendo un paso de lavado con solución de lavado AbsoluteRNA (Applied Biosystems), nuevamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración y la pureza del ARN eluido fueron determinadas sobre un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Labtech Internacional Ltd, Reino Unido). En ocasiones y para incrementar la concentración de nucleótidos, se realizó un segundo procedimiento de purificación utilizando el Kit de limpieza RNeasy MinElute<sup>MR</sup> (Qiagen Ltd, Manchester, Reino Unido) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta el procesamiento en microarreglo (microarray), posterior.

**Procesamiento del microarreglo (microarray)**

El ARN total (100 ng) fue marcado utilizando un kit de expresión Ambion WT (Life Technologies, Bleiswijk, Holanda) e hibridado a los genes 19.732 que codifican los arreglos del genoma humano completo GeneChip Human Gene 1.1 ST (Affymetrix, Santa Clara, CA). La marcación de la muestra, la hibridación a los chips y el barrido de imagen fueron realizados de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

**Análisis de datos de microarreglo (microarray)**

El análisis de microarreglo fue realizado utilizando la fuente de información MADMAX para el análisis estadístico de los datos de microarreglo. Para el análisis posterior se utilizó una anotación personalizada con base en las sondas oligonucleotídicas reorganizadas, las cuales combinan todas las sondas individuales para un gen. Únicamente los genes que tuvieron al menos cinco sondas presentes sobre el arreglo, fueron tomadas en cuenta. Los valores de expresión fueron calculados utilizando el método de promedio de multichip robusto (RMA por sus siglas en inglés), el cual incluye la normalización de los Cuantiles. Los datos de microarreglo fueron filtrados, y los grupos de sondas con valores de expresión mayores de 20 en más de cuatro arreglos, fueron considerados como expresados y seleccionados para el análisis estadístico posterior. Además, se utilizó un corte de 0,25 del Intervalo inter-Cuartil (IQR) para filtrar los genes que mostraron poca variación entre las condiciones. Las diferencias significativas en la expresión fueron evaluadas utilizando la estadística T moderada, Basada en Intensidad, apareada (IBMT [5]). Los genes fueron definidos como significativamente cambiado cuando el valor p fue <0,01.

Para evaluar la similitud de la regulación de los genes por el peptidoglicano en la forma soluble y particulada, únicamente los genes que fueron significativamente cambiados por al menos uno de los dos tratamientos, fueron considerados. Para esos, las proporciones logarítmicas de la señal promedio (SLR; cambio proporcional logarítmico) de cada estimulante comparado al tratamiento control, fueron calculados y visualizados en una gráfica de correlación [donde cada punto representa un gen único]. [La línea de correlación perfecta fue superpuesta sobre los datos, y los límites que corresponden al aumento y disminución dobles fueron calculados por la adición de +1 o -1 a cada punto de la línea de correlación perfecta].

**Resultados****Los miméticos sintéticos generan nanopartículas porosas de fosfato de calcio amorfo**

El fosfato de calcio que fue sintetizado utilizando un protocolo modificado de Boskey, produjo nanopartículas homogéneas en el mismo intervalo de tamaño a sus contrapartes intestinal *in vivo* (Figura 1a) y comprendieron predominantemente calcio, fósforo y magnesio (Figura 1b). Consistente con nuestros hallazgos previo *in vivo*, el análisis mediante microscopio electrónico de transmisión, de barrido de campo oscuro, anular, de ángulo alto (HAADF-STEM; Figura 1c-1e), y luego la reconstrucción tridimensional de los cúmulos de AMCP sintéticos, cargados con proteína (Figura 1f-1i) confirmaron la naturaleza porosa de las partículas (tamaño promedio de poro de 1-3 nm).

**Los miméticos sintéticos se modelan alrededor de componentes inorgánicos y orgánicos**

Los resultados mostraron que la porosidad fue en parte debido a las partículas que se modelan alrededor de los componentes inorgánicos y orgánicos que estaban presentes en las soluciones madre (por ejemplo, nanopartículas de óxido de hierro, proteínas y/o componentes bacterianos). Por su puesto, cuando los miméticos sintéticos fueron preparados en presencia de nanopartículas de óxido de hierro, TEM mostró nanopartículas sintéticas de fosfato de calcio amorfo con pequeñas partículas de nano-hierro incorporadas a todo lo largo (Figura 2a). La reconstrucción tomográfica por microscopio electrónico de transmisión de barrido (STEM) de una partícula de nanopartículas de hierro, de fosfato de calcio amorfo sintético, confirmó adicionalmente la distribución interna y externa uniforme de las partículas de las nanopartículas de hierro más pequeñas (Figura 2b-2d). En general, se encontró que los miméticos sintéticos se incorporan 50 a 70 % del material orgánico agregado (figura 2e).

En experimentos adicionales, las moléculas de carga que incluyen el Muramil-dipéptido (MDP), Lipopolisacáridos (LPS), poli I: C y ácido retinoico (RA) han demostrado que están incorporados en las nanopartículas de AMCP sintéticas de acuerdo a la presente invención.

**Los miméticos sintéticos permanecen estables bajo condiciones de cultivo celular**

Habiendo generado exitosamente los miméticos para el nanomineral endógeno intestinal, y para entender adicionalmente su relevancia/función *in vivo*, verificamos primeramente si las nanopartículas de fosfato de calcio amorfo mantenían sus propiedades estructurales y químicas cuando eran probadas en condiciones de cultivo celular. Como se muestra en las Figuras 3a-3b, el fosfato de calcio mimético en presencia de su carga mantuvieron su proporción de calcio a fósforo y su tamaño promedio de 70 nm.

**Los miméticos sintéticos son una plataforma silenciosa de distribución de antígenos**

Fueron llevadas a cabo investigaciones para investigar si estas partículas eran bien absorbidas por las células inmunitarias primarias y si su absorción pudiera modular las respuestas inmunitarias a la carga llevadas en éstas. La incubación con miméticos sintéticos probó ser segura ya que no sobrevino la muerte celular. En segundo lugar, y como se muestra en las Figuras 4a-4c, estas nanopartículas (figura 4b, calceína) fueron eficientemente absorbidas por los monocitos (Figura 4b, CD14) y transportadas a los compartimentos lisosomales (Figura 4b CD107 y superposición). Además, fue interesante notar que mientras que la absorción de las partículas que contenían componentes bacterianos (es decir Pg) pareció mayor (Figura 4a), las partículas per se no cambiaron el perfil de expresión génica obtenido cuando fue distribuida la misma dosis de peptidoglicano por si sola (Figura 4c). La figura 10 muestra los valores de expresión log2 promedio de los genes, después de 3 horas de exposición a la AMCP sintética, correlacionada contra aquellos del tratamiento control con vehículo (n = 7). Esto demuestra que las células retadas con las nanopartículas de AMCP sintéticas, cargadas con proteína, mostró una "firma" transcriptómica similar a aquella de las células no retadas (control). La línea teórica de la correlación perfecta es mostrada en negro mientras que los límites correspondientes al aumento y disminución dobles se muestran en rojo. En resumen, los miméticos sintéticos de los minerales de fosfato de calcio intestinal endógeno probaron ser una plataforma segura y adecuada para la distribución de antígeno, y de manera contraria a otros fosfatos de calcio, la distribución de su carga de una manera silenciosa/inerte.

**Parte III: propiedades celulares de las nanopartículas de fosfato de calcio amorfo**

**Respuestas de células T CD4 específicas de antígeno, reducidas hacia el antígeno-lipopolisacárido co-distribuido por los miméticos de nanopartículas de fosfato de calcio amorfo, intestinales**

Estos datos demuestran la inhibición de las respuestas de células T específicas de antígeno, por la portación de partículas de MAMP no está restringida a aquella del peptidoglicano, e incluye adicionalmente los lipopolisacáridos co-distribuidos con el antígeno de células T por los materiales de fosfato de calcio amorfo de la presente invención (figuras 5a-5c).

**AMCP y el inflammasoma**

Las PBMC provenientes de 2 a 4 sujetos fueron primeramente pre-estimuladas con LPS por 3 horas (10 ng/ml, columnas a rayas), o sin (columna solida), para inducir pro-IL1 $\beta$  y luego adicionalmente incubadas (3 horas) con un control negativo (es decir, el medio de cultivo tisular) o con ACP/BSA. Como se muestra en la Figura 6a y 6b, ACP/BSA no indujeron respuestas de IL-1 $\beta$  diferentes de aquella observada para el control negativo a cualquiera de los puntos de tiempo estudiados. Esto fue también cierto para las partículas que llevan un componente peptidoglicano adicional (sPg) dentro de su carga (figura 6c-6d).

Mientras que las partículas de ACP/BSA no parecieron modular significativamente las respuestas a Pg al nivel de IL-1 $\beta$  (figura 7a), no obstante éstas parecieron incrementar la secreción de la IL-10 anti-inflamatoria (figura 7b).

En general, los datos demuestran que los miméticos sintéticos del nanomineral de fosfato de calcio endógeno, no activan la plataforma de inflammasoma, son capaces de distribuir su carga hacia las células, no modulan las respuestas de IL-1 $\beta$  hacia Pg, sino más bien incrementan las señales anti-inflamatorias. Esto significa que las nanopartículas del fosfato de calcio amorfo (AMCP) de la presente invención tienen la propiedad de no enmascarar o alterar la presentación de antígeno de las moléculas de carga hacia las células que han absorbido las nanopartículas. Esto significa que las nanopartículas de AMCP puedan ser utilizadas como un agente de distribución para las moléculas de carga que sustancialmente no dan como resultado un efecto adyuvante provocado por las nanopartículas de AMCP mismas.

**Parte IV: El papel de la expresión de PD-L1 en los métodos de la enfermedad de Crohn**

Secciones de tejido del íleon humano, congeladas, que contenían placas de Peyer, fueron adquiridas de un banco de tejidos (Tissue Solutions, Reino Unido) con la ética apropiada en su lugar. Las muestras control fueron provenientes de márgenes de resección de pacientes con tumores o colitis ulcerativa (3 con tumores carcinoides ileales, 2 con adenocarcinoma del colon, 1 con melanoma maligno del intestino delgado y 2 con colitis ulcerativa). Las muestras de enfermedad de Crohn fueron provenientes de pacientes con ubicaciones anatómicas de enfermedad de Crohn diferentes (3 ileales, 1 ileocecales, 2 con involucramiento ileal y del intestino grueso y una colónica únicamente). La

tinción seccional y la formación de imágenes confocal fueron emprendidas en parejas (o múltiplos de las mismas) tal que una sección de Crohn fue siempre acompañada por una sección no de Crohn con tratamientos idénticos a ambos. Por lo tanto, todas las muestras fueron igualmente seccionadas y co-teñidas.

5 Las placas de Peyer fueron crio-seccionadas (Leica CM30505) a 14  $\mu\text{m}$  y recolectadas sobre porta objetos SuperFrost® (Thermo Scientific, USA) y se dejaron secar al aire por 30 min a temperatura ambiente.

10 Después de la fijación en 4 % de formaldehído (4 °C, 15 min), las secciones humanas fueron lavadas con solución salina amortiguada con Tris (pH 8,0) e incubadas con el anticuerpo primario de ratón anti-PD-L1 humano ((M1H1) eBioscience (14-15983)) por 4 horas a 4 °C. Después del lavado adicional en solución salina amortiguada con Tris (pH 8,0), los portaobjetos fueron luego incubados con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón Alexa Fluor® 568 [IgG (H+L), Invitrogen Life Technologies (A11004)] por dos horas a 4 °C. Para permitir la detección de fosfato de calcio nano-mineralizado, fueron luego lavadas las secciones en tres cambios de solución salina amortiguada con Tris (pH 8,0), por 5 minutos cada una e incubadas con la solución de calceína Tris-HCL por 1,5 horas, a 4 °C en la oscuridad. Después de la incubación, las secciones fueron lavadas cuidadosamente con tres cambios de solución salina amortiguada con Tris (pH 8,0), por 5 minutos cada uno, y finalmente contra teñidas con el colorante nuclear To-Pro-3 (Invitrogen Life Technologies, 1  $\mu\text{m}$ ). Después de tres cambios de la solución salina amortiguada con Tris (pH 8,0), por 1 minuto, las secciones fueron permanentemente montadas con el reactivo anti-desvanecimiento de oro ProLong® (Invitrogen, reino Unido).

20 Las secciones fueron formadas en imagen con un microscopio Leica DMIRE2 (Leica Microsystems, Alemania) a 488, 568 o 633 nm, equipado con un diodo Ar/ArKr y láseres de HeNe, utilizando un lente objetivo de agua x63, 1,2 NA. Los datos fueron registrados utilizando el Software Leica Confocal (v2.61) y las imágenes procesadas utilizando el software ImageJ de fuente abierta. Rutinas idénticas de formación de imágenes y de recolección de datos fueron aplicadas a secciones de la enfermedad de Crohn y sin enfermedad de Crohn.

### **Resultados y Conclusiones**

30 Consistentemente, la formación de imágenes mostró números similares de células positivas a la calceína en el domo sub-epitelial de los folículos linfoides de las placas de Peyer, provenientes de muestras de tejido de Crohn y no Crohn. No obstante, mientras que las células positivas a la calceína mostraron también alta expresión de PD-L1 en las muestras de tejido provenientes con sujetos sin enfermedad de Crohn, y nuevamente consistentemente así, éstas fueron principalmente negativas a PD-L1 o, a lo más, PD-L1 bajo en muestras con enfermedad de Crohn. La presencia o ausencia de tumores o inflamación en las muestras formadas en imagen, no pudo explicar esas observaciones. Similarmente, el sitio de enfermedad (es decir, ya sea ileal, colónico o ambos) no pudo explicar estos hallazgos. No existió relación tampoco para la edad. La conclusión de ese trabajo es que la falla para expresar apropiadamente PD-L1 sobre las células que reciben y presentan el antígeno luminal en los folículos linfoides intestinales, es subyacente a la causa de la enfermedad de Crohn, debido a que este antígeno no será presentado en el contexto tolerogénico. Mientras que no se desea estar comprometido por alguna teoría en particular, los presentes inventores creen que una falla inherente en estas células para aumentar PD-L1 en respuesta al peptidoglicano, que es similarmente distribuido por el nanomineral luminal, explica por qué estas células son tan universalmente bajas en PD-L1 en la enfermedad de Crohn.

### **Referencias:**

- 45 Boskey & Posner, J Phys. Chem., 77(19): 2313-2317, 1973.
- Boskey & Posner, Mat. Res. Bull. 9: 907-916, 1974.
- 50 Zhao et al., Chemistry Central Journal, 5: 40-47, 2011.
- Li & Weng (J. Mater. Sci.: Mater. Med., 18: 2303-2308, 2007.
- Jugdaohsingh et al. P.N.A.S., 99(6): 3394-3399, 1999.
- 55 Iliev et al., Mucosal. Immunol., 2(4): 340-350, 2009.
- Iliev et al., Gut, 58(11): 1481-1489, 2009.
- 60 Rimoldi et al., Nat Immunol, 2005. 6(5): 507-514, 2005.
- Maheshwari et al., Gastroenterology, 140(1): 242-253, 2011.
- Mann et al., Inflamm. Bowel Dis., 18(7): 1275-1286, 2012.
- 65 den Hartog et al., Int. Arch. Allergy Immunol., 162(3): 225-36, 2013.

- Zeuthen et al., *Immunology*, 123(2): 197-208, 2008.
- 5 Steinbrink et al., *J. Immunol.*, 159(10): 4772-80, 1997.
- Bamias et al., *PLoS One*, 8(8): p. e72594, 2013.
- Adolph et al., *Nature*, 2013.
- 10 Sakai et al., *Int. Immunol.*, 22(12): 915-25, 2010.
- Lee et al., *FEBS Lett.*, 580(3): 755-762, 2006.
- 15 Dong et al., *Nat Med.*, 8(8): 793-800, 2002.
- Kan-o et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 435(2): 195-201, 2013.
- Seyerl et al., *Eur J Immunol.*, 40(2): 321-329, 2010.
- 20 Trabattoni et al., *Blood*, 101(7): 2514-20, 2003.
- Gong et al., *J Immunol.*, 182(3): 1325-33, 2009.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición para usarse en un método de distribución de un material de carga biológicamente activo hacia el tracto gastrointestinal, comprendiendo la composición fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo (AMCP), el cual atrapa un material de carga biológicamente activo, con lo cual hace posible que el material de carga sea distribuido hacia un sitio de interés en el tracto gastrointestinal.
- 10 2. Una composición para usarse en un método de tratamiento o de prevención de una enfermedad, mediante la distribución de un material de carga biológicamente activo hacia el tracto gastrointestinal, en donde la composición comprende el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo (AMCP) el cual atrapa el material de carga biológicamente activo, con lo cual hace posible que el material de carga sea distribuido hacia un sitio de interés en el tracto gastrointestinal.
- 15 3. La composición para usarse en un método de tratamiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde:
- (a) el fosfato de calcio sustituido con magnesio es amorfo tal como se determina mediante difracción de rayos X; y/o
  - (b) el patrón de difracción de rayos X del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo es ancho y difuso con un máximo de 25 grados 2 theta; y/o
  - (c) el patrón de difracción de rayos X del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo carece de uno o más picos asociados al patrón de difracción de rayos X de la hidroxapatita cristalina.
- 20 4. La composición para usarse en un método de tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo es capaz de dispersarse para formar nanopartículas que son capaces de ser absorbidas por las células en el tracto gastrointestinal, opcionalmente en donde las nanopartículas son capaces de ser absorbidas por las células inmunitarias de la mucosa intestinal.
- 25 5. La composición para usarse en un método de tratamiento de la reivindicación 4, en donde las células del tracto gastrointestinal son células inmunitarias presentadoras de antígeno presentes en el intestino.
- 30 6. La composición para usarse en un método de tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición distribuye el material de carga biológicamente activo hacia las placas de Peyer o hacia los nódulos linfáticos mesentéricos (MLN).
- 35 7. La composición para usarse en un método de tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición es para la administración oral, administración nasogástrica o administración rectal, opcionalmente en donde la composición es encapsulada para la administración oral.
- 40 8. La composición para usarse en un método de tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:
- (a) el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo es capaz de dispersarse para formar nanopartículas que son capaces de ser absorbidas por las células positivas a CD11b y/o células positivas a CD11c; y/o
  - (b) el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo es capaz de dispersarse para formar nanopartículas que son capaces de ser absorbidas por las células dendríticas y/o los macrófagos.
- 45 9. La composición para usarse en un método de tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:
- (a) el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo es para usarse en un método de tratamiento en una enfermedad auto-inmunitario, cáncer, alergias y/o intolerancias a alimentos; y/o
  - (b) el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo es para usarse en un método de tratamiento o prevención de enfermedad inflamatoria del intestino; y/o
  - (c) el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo es para usarse en un método de tratamiento o de prevención de la enfermedad de Crohn o enfermedad celiaca; y/o
  - (d) el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo es para usarse en un método de vacunación de un sujeto y la molécula de carga biológicamente activa es una composición de vacuna terapéutica.
- 50 10. La composición para usarse en un método de tratamiento de la reivindicación 9, en donde:
- (i) la composición de vacuna terapéutica es para el tratamiento o la prevención del cáncer tales como una Leucemia Mieloide; o
  - (ii) la composición de vacuna terapéutica es para el tratamiento o la prevención de enfermedades autoinmunitarias, en donde la composición de vacuna es capaz de inducir tolerancia hacia las células T autoinmunitarias y respuestas de auto-anticuerpo, opcionalmente en donde la enfermedad autoinmunitaria es esclerosis múltiple; o
  - (iii) la composición de vacuna terapéutica es para el tratamiento o la prevención de enfermedad inflamatoria del
- 55 60 65

intestino, opcionalmente en donde la enfermedad inflamatoria del intestino es enfermedad de Crohn o enfermedad celíaca (celíaca); o

(iv) la composición de vacuna terapéutica es para el tratamiento o la prevención de la diabetes tipo 1; o

(v) la composición de vacuna terapéutica es para el tratamiento o la prevención de lupus eritematoso sistémico (SLE).

11. La composición para usarse en un método de tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material de carga es una molécula de carga o una nanopartícula de carga.

12. La composición para usarse en un método de tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:

(a) el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo comprende nanopartículas agregadas que son capaces de dispersarse para distribuir el material de carga biológicamente activo hacia el sitio de interés, opcionalmente en donde las nanopartículas son nanopartículas a base de metal o nanopartículas a base de oxo-hidróxido metálico; y/o

(b) el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo es una plataforma de distribución silenciosa que no provoca una respuesta de adyuvante hacia el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo en el sitio de interés, que difiere sustancialmente de la respuesta hacia el material de carga biológicamente activo solo; y/o

(c) el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo es una plataforma de disolución silenciosa que no provoca una respuesta transcripcional directa hacia el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo en el sitio de interés; y/o

(d) el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo es estabilizado por los iones magnesio y/o la molécula de carga biológicamente activa.

13. La composición para usarse en un método de tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proporción de Mg: Ca en el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo es al menos 1:25, más preferiblemente al menos 1:20, más preferiblemente al menos 1:10, más preferiblemente al menos 1:5, más preferiblemente al menos 1:4 y lo más preferiblemente 1:3.

14. La composición para usarse en un método de tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo la composición de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo una pluralidad de moléculas de carga, opcionalmente en donde la composición de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo comprende dos o más moléculas de carga diferentes o en donde la composición del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo comprende tres o más moléculas de carga diferentes.

15. La composición para usarse en un método de tratamiento de la reivindicación 14, en donde la composición del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo comprende un componente de vacuna terapéutica y un agente inmunoestimulador un agente inductor de tolerancia.

16. La composición para usarse en un método de tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material de carga biológicamente activo es una molécula de carga terapéutica o el material de carga biológicamente activo es una molécula de carga nutracéutica.

17. La composición para usarse en un método de tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:

(a) el material de carga es seleccionado del grupo que consiste de antígenos proteicos, citocinas bioactivas, peptidoglicanos, moléculas orgánicas de bajo peso molecular y nanopartículas; y/o

(b) los materiales de carga son seleccionados del grupo que consiste en peptidoglicano, subunidades de peptidoglicano incluyendo muramil-dipéptido, autoantígenos, composiciones de vacuna, secuencias de ácido nucleico, moléculas para restaurar la expresión de PD-L1 hacia la célula objetivo, homogeneizados/suspensiones/sobrenadantes tisulares o celulares, nutrientes, suplementos dietéticos, proteínas, antígenos proteicos incluyendo secuencias peptídicas y alérgenos; y/o

(c) el material de carga es un nutriente, una nanopartícula, o una molécula terapéutica, una vacuna, o una molécula de ácido nucleico, tal como ADN o ARN.

18. La composición para usarse en un método de tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición es utilizada para distribuir moléculas de carga hacia las células ex vivo, en donde las células ex vivo que comprenden las moléculas de carga distribuidas, son para la re-introducción dentro de un receptor y/o en donde las células afectadas por las células ex vivo transfectadas con la carga son para la re-introducción dentro de un receptor.

19. La composición para usarse en un método de tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo es porosa para atrapar las moléculas de carga y/o las nanopartículas del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo tienen diámetros medios en un

intervalo entre 20 nm y 350 nm, opcionalmente en donde al menos el 75 % de las nanopartículas del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo tienen un diámetro medio en el intervalo.

- 5 20. Una composición para usarse en un método *in vivo* de diagnóstico o de formación de imágenes, en donde la composición comprende el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo (AMCP), en donde el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo atrapa una porción detectable, en donde la composición del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo es capaz de distribuir el material de carga hacia un sitio de interés en el tracto gastrointestinal.
- 10 21. La composición para usarse en un método *in vivo* de diagnóstico o de formación de imágenes de la reivindicación 20, en donde el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo es capaz de distribuir el material de carga hacia un sitio de interés en el tracto gastrointestinal, opcionalmente en donde la porción detectable comprende nanopartículas, tales como nanopartículas a base de metal o nanopartículas oxo-hidróxido metálico.
- 15 22. Un proceso para producir composiciones de fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo que contienen el material de carga biológicamente activo atrapado, comprendiendo el proceso
- (a) proporcionar una solución que comprende iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), e iones magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) y una solución que comprende iones fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), en donde una o ambas de las soluciones comprenden uno o más materiales de carga biológicamente activos;
- 20 (b) mezclar la solución que comprende los iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), los iones magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) con la solución que comprende los iones fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) para precipitar el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo en el que está atrapado el material de carga biológicamente activo;
- (c) recuperar el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo; y
- 25 (d) lavar y secar opcionalmente el fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo.
23. El proceso de la reivindicación 22, en donde:
- (a) la solución que comprende los iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), los iones magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) y las moléculas de carga biológicamente activas, es tamponada a un pH de al menos 8,0; y/o
- 30 (b) el material de carga biológicamente activo incrementa la estabilidad del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo frente a la conversión a fases cristalinas de fosfato de calcio, en comparación con las composiciones correspondientes que no incluyen el material de carga atrapado; y/o
- (c) el paso de lavado y secado comprende la re-suspensión de la composición en acetona, y el secado de la composición lavada utilizando centrifugación, opcionalmente en donde los pasos de lavado y secado son repetidos
- 35 dos veces; y/o
- (d) el pH durante los pasos (a) y/o (b) es mayor de 8,30; y/o
- (e) el tampón es Tris, HEPES, BICINE, TRICINE o un tampón de ácido cítrico, o un aminoácido tal como lisina o glicina.
- 40 24. El proceso de la reivindicación 22 o la reivindicación 23, que comprende además la formulación del fosfato de calcio sustituido con magnesio amorfo como una composición farmacéutica.

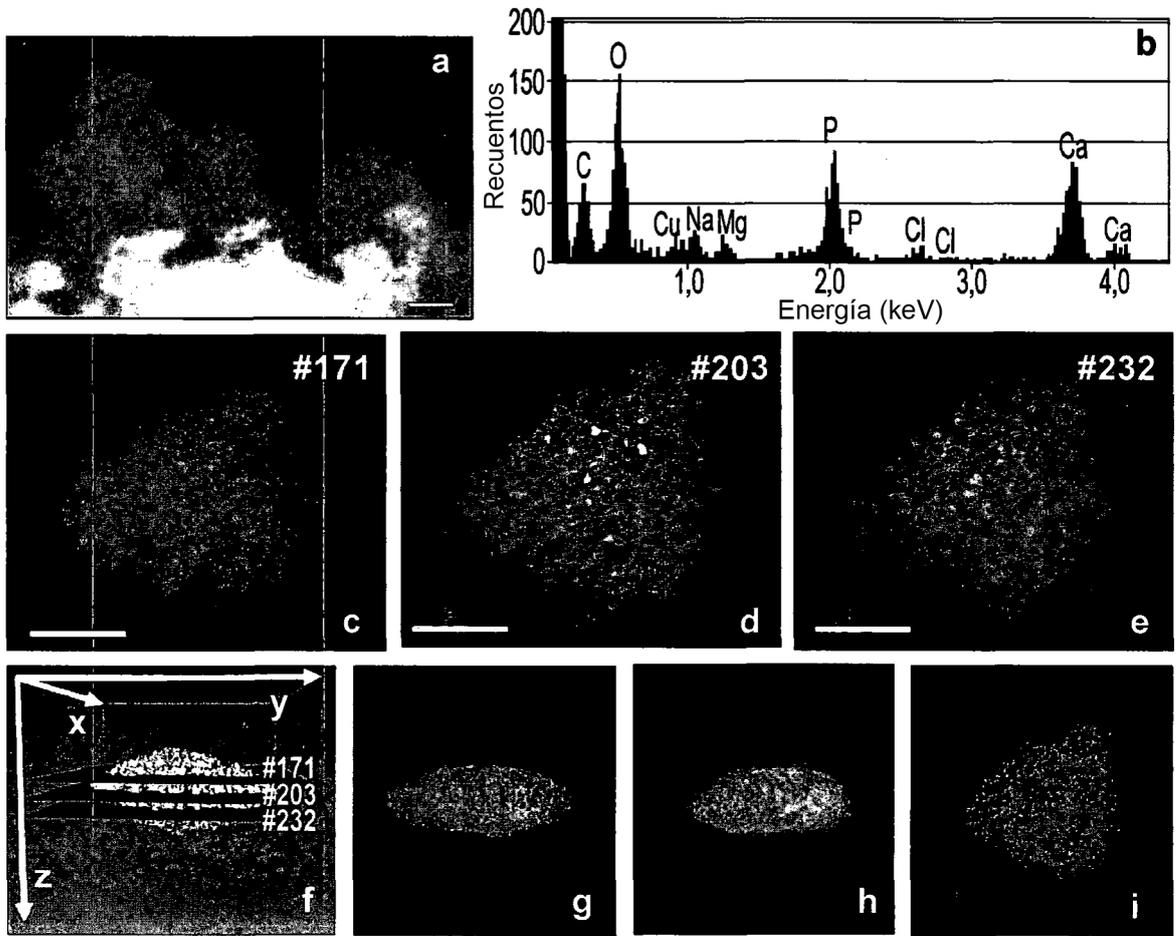


FIG. 1

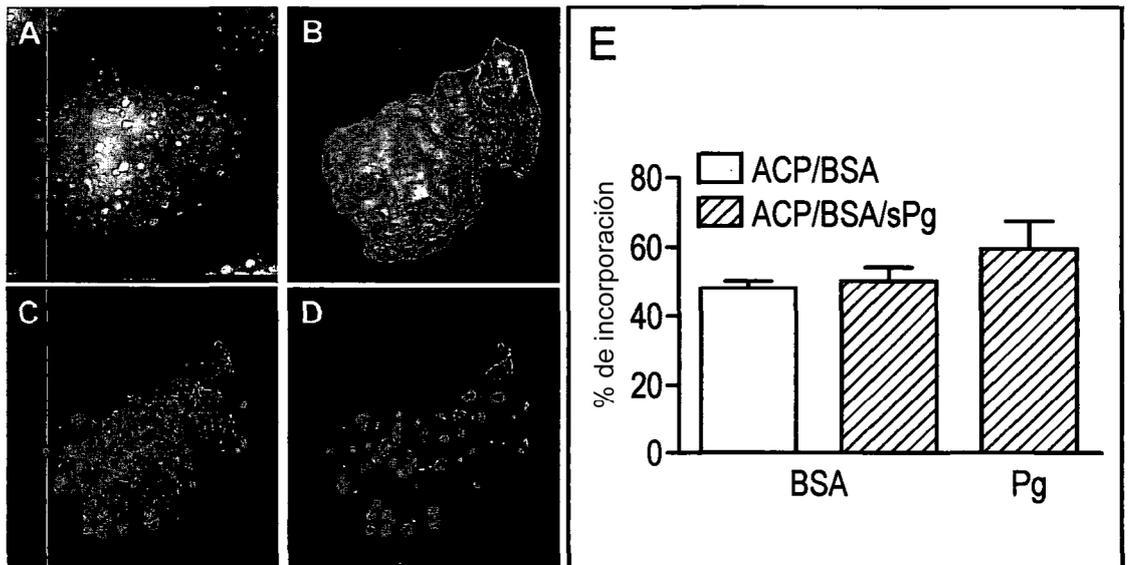


FIG. 2

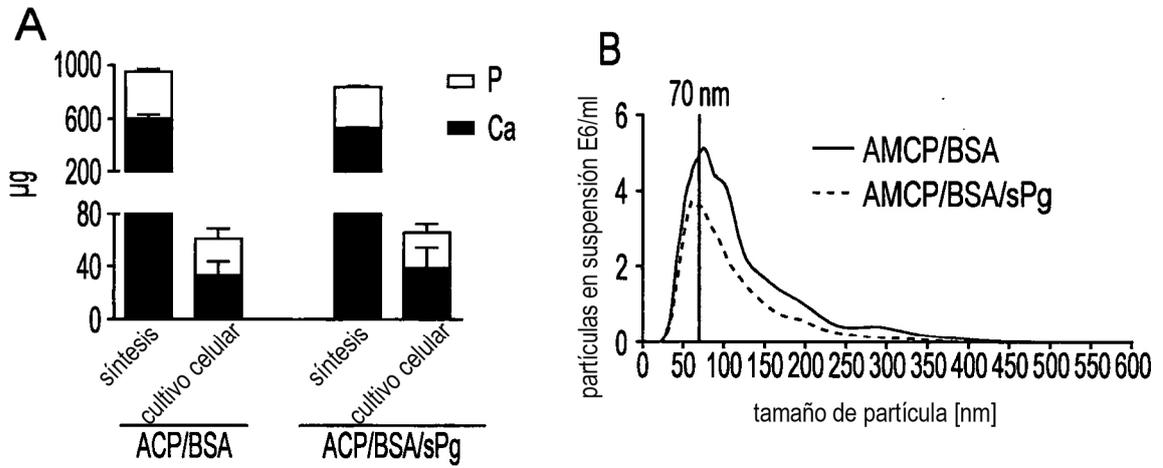


FIG. 3

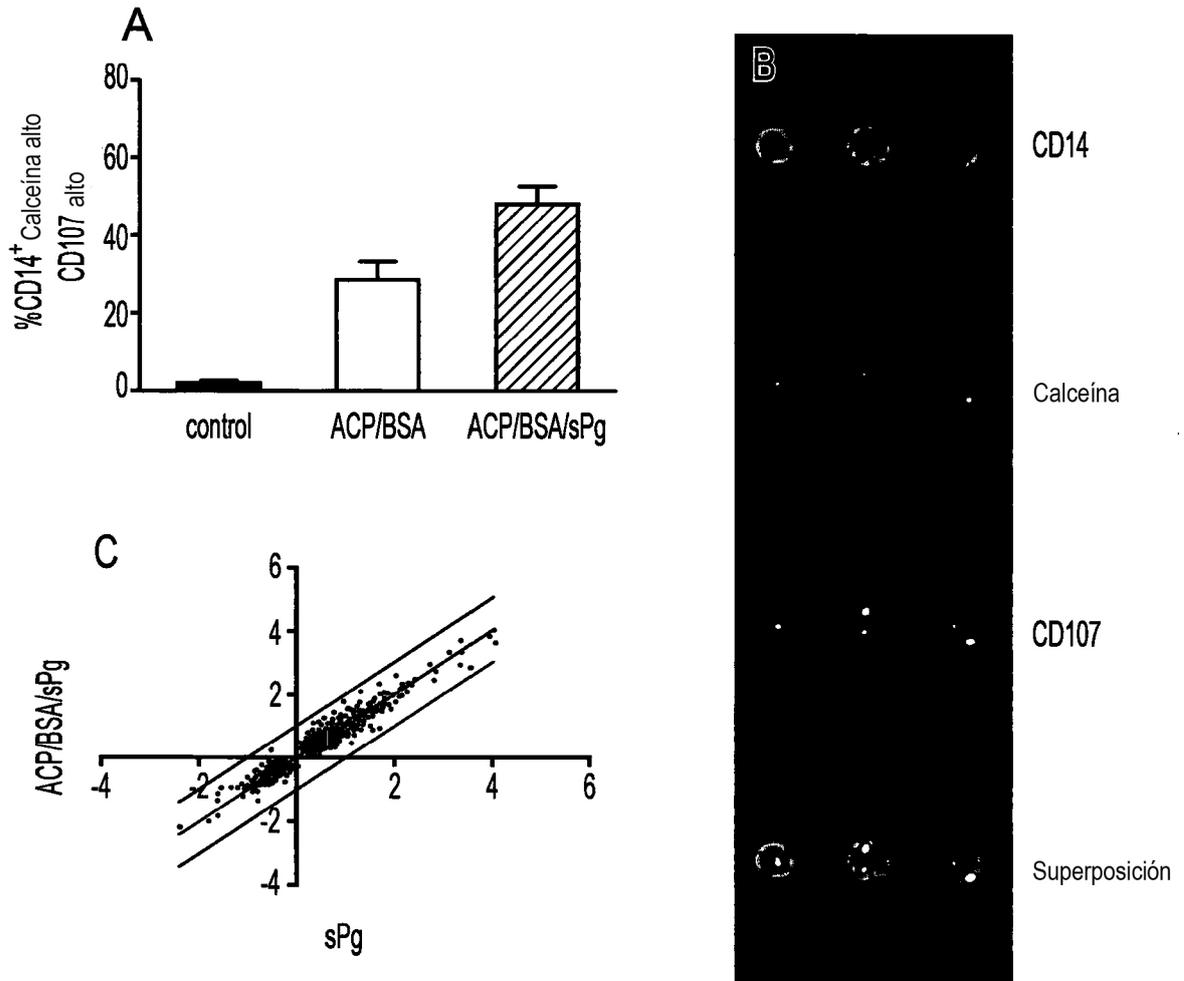


FIG. 4

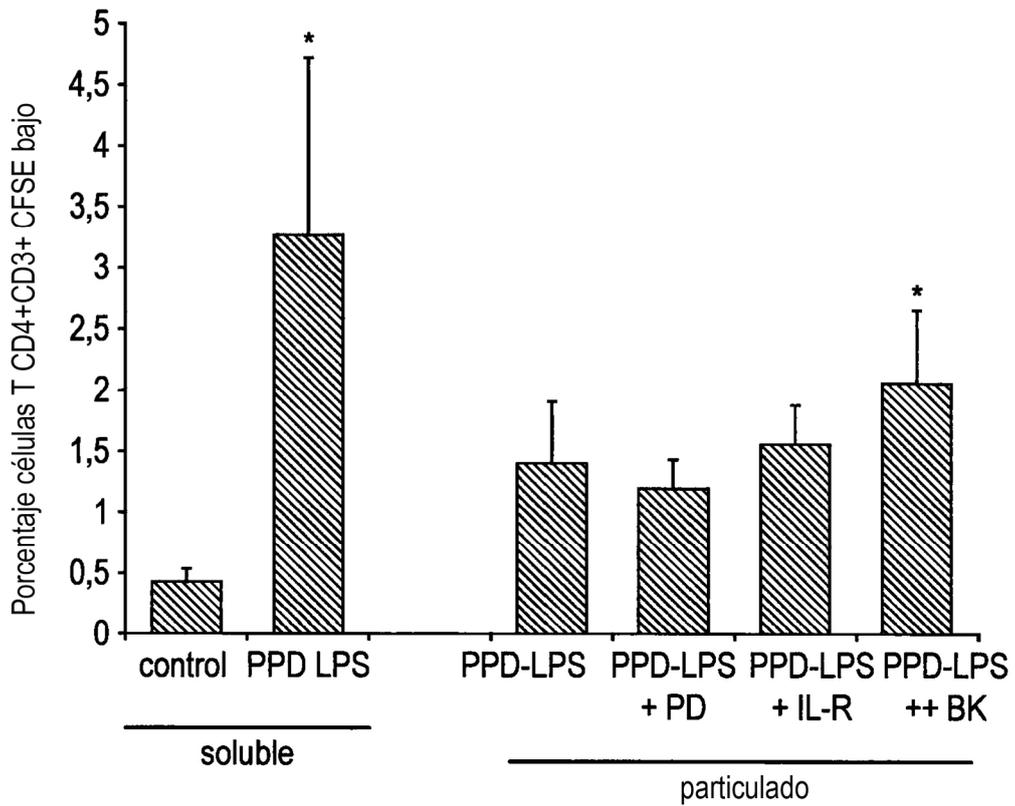
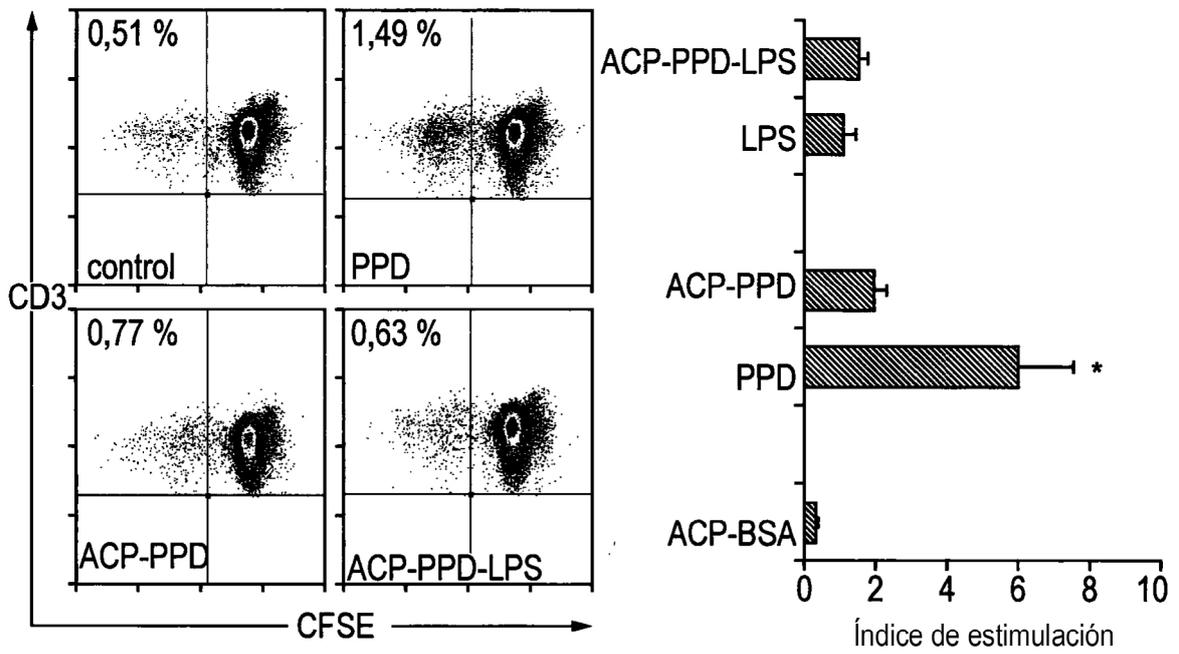


FIG. 5

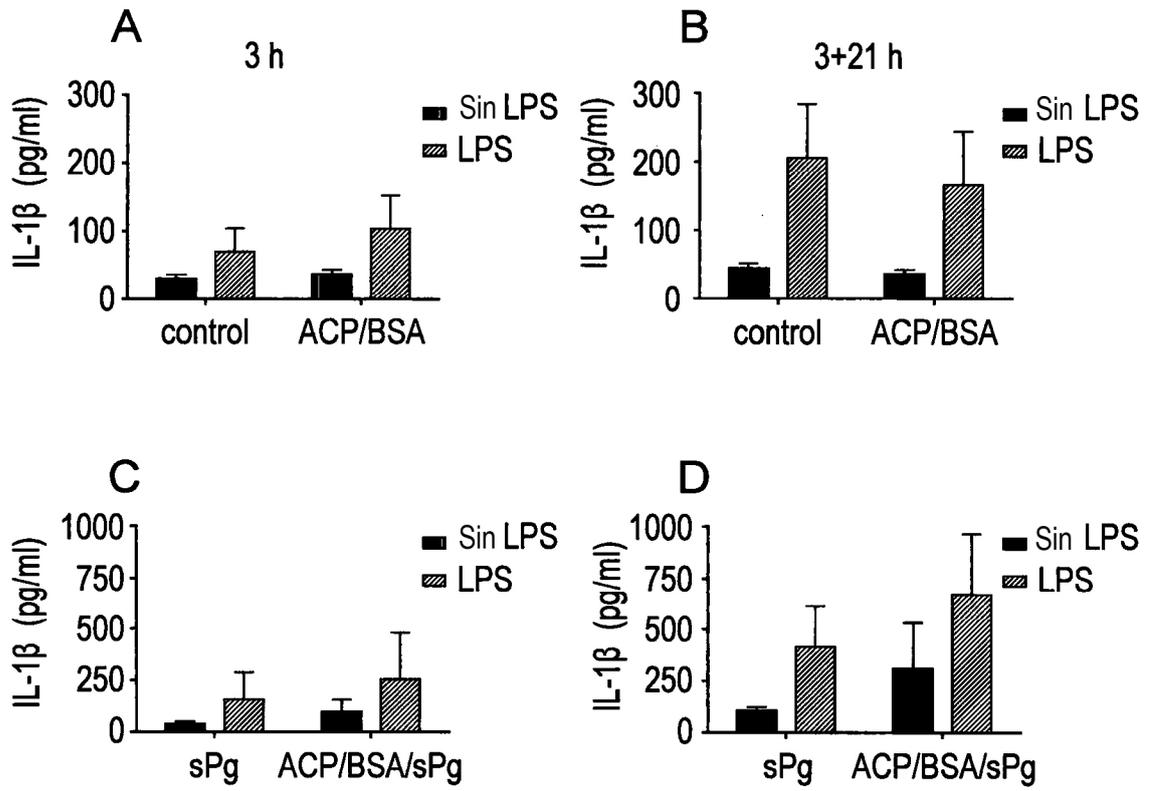


FIG. 6

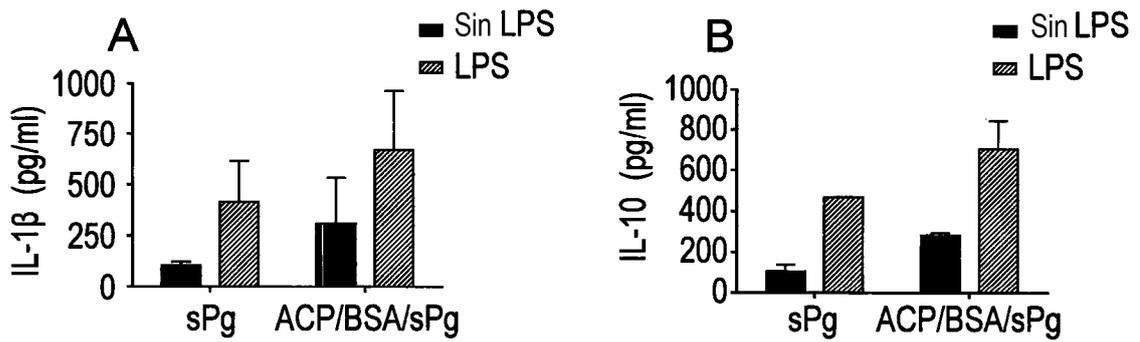


FIG. 7

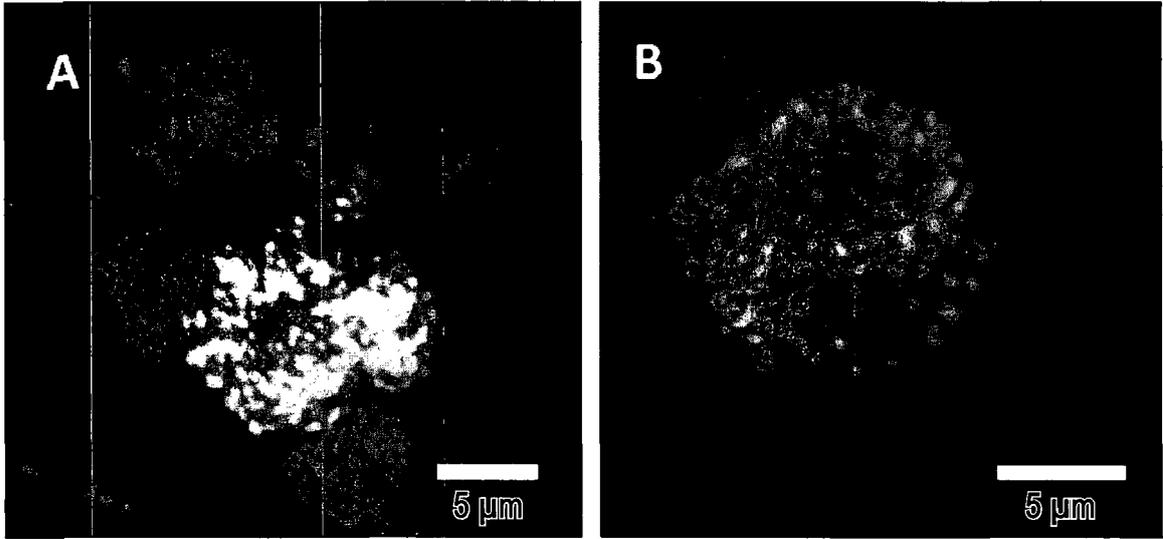


FIG. 8

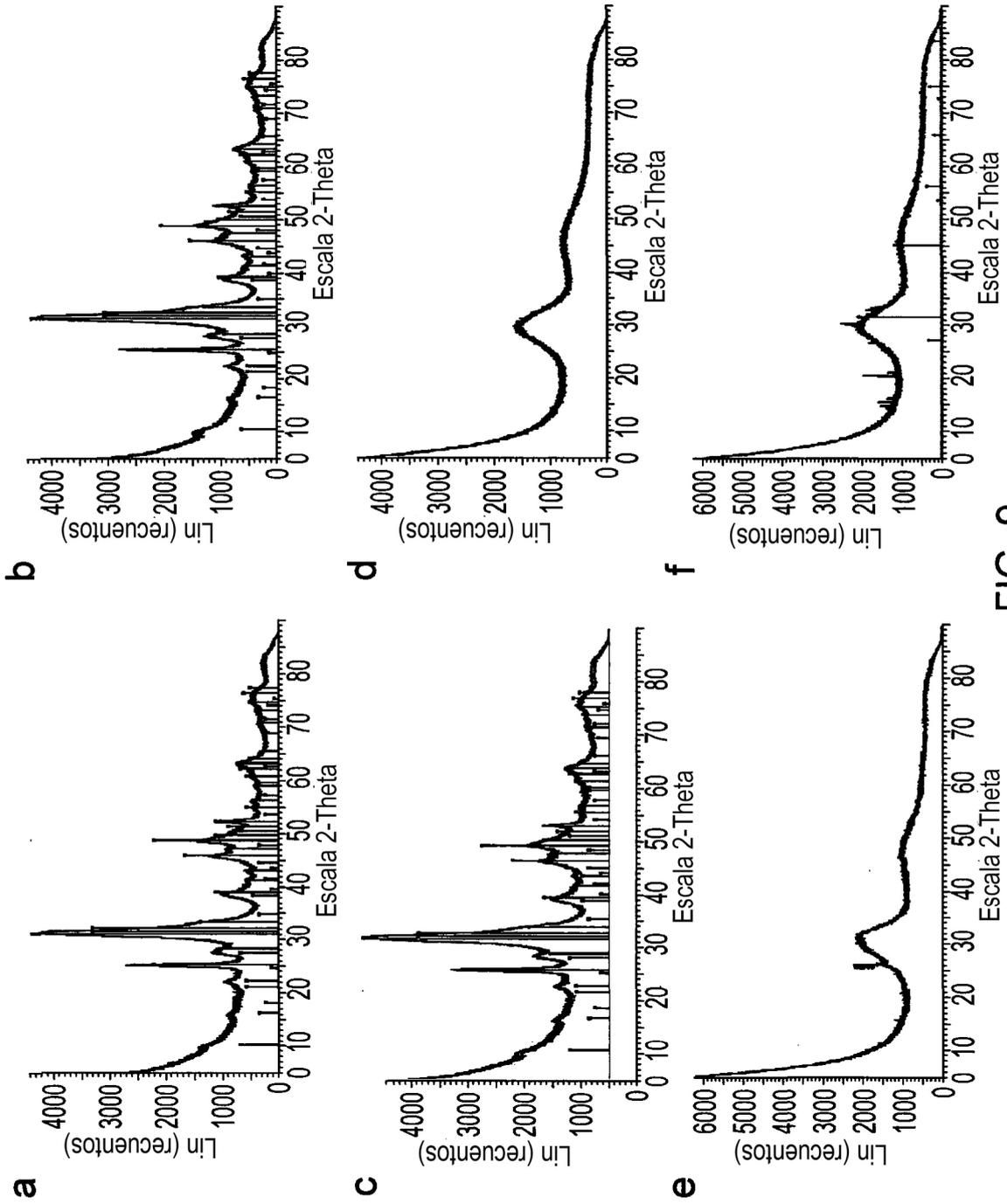


FIG. 9

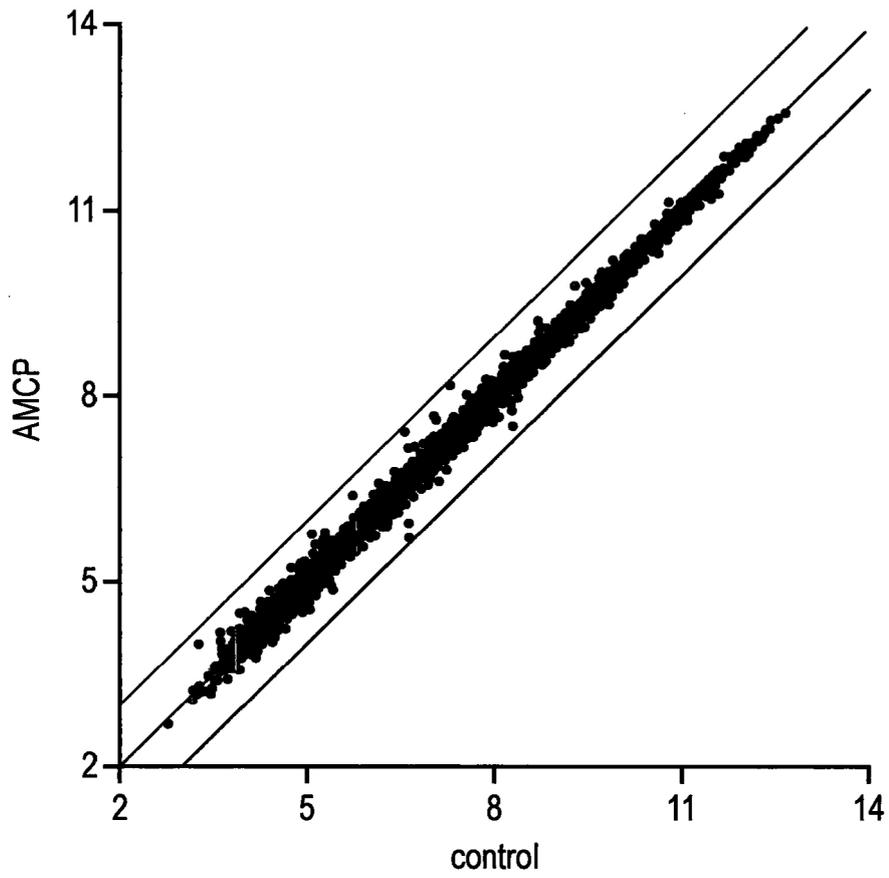


FIG. 10

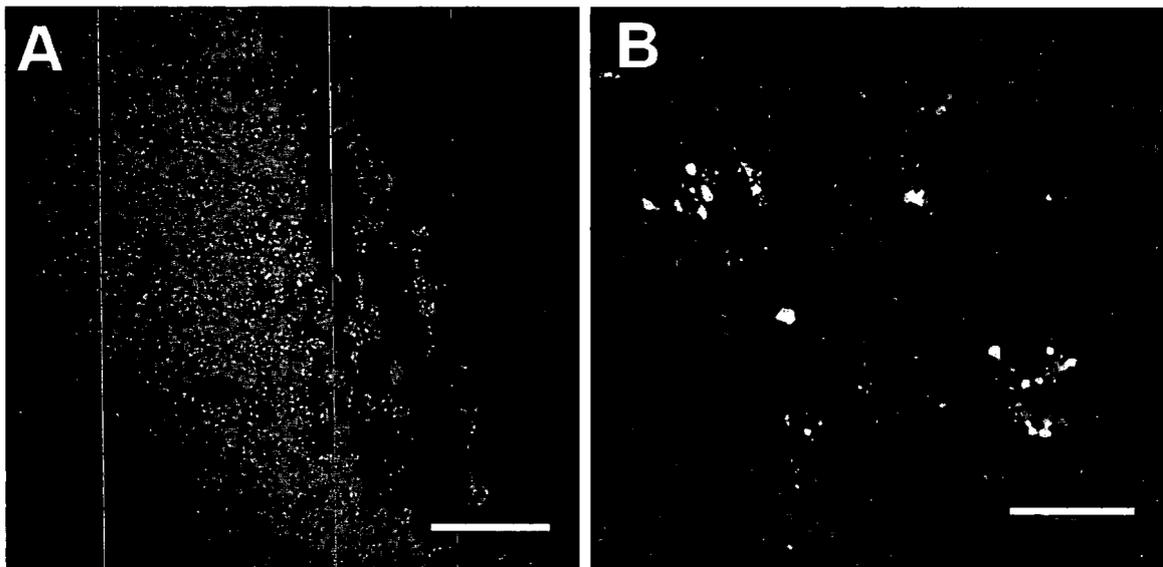


FIG. 11