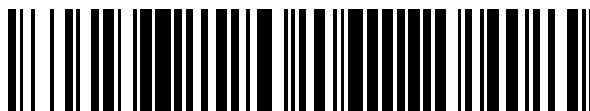


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 187**

51 Int. Cl.:

A61K 47/69 (2007.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2014 PCT/US2014/050962**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2015 WO15023796**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2014 E 14836306 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3033102**

54 Título: **Partículas conjugadas con péptidos**

30 Prioridad:

13.08.2013 US 201361865389 P

23.08.2013 US 201361869279 P

04.10.2013 US 201361887112 P

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

22.05.2020

73 Titular/es:

NORTHWESTERN UNIVERSITY (100.0%)

633 Clark Street

Evanston, IL 60208, US

72 Inventor/es:

SHEA, LONNIE D;

MILLER, STEPHEN D.;

YAP, JONATHAN WOON TECK;

GETTS, DANIEL R. y

MCCARTHY, DERRICK

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 762 187 T3

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

DESCRIPCIÓN

Partículas conjugadas con péptidos

Solicitudes relacionadas La solicitud reivindica prioridad en relación con la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos N.º 61/865 389, presentada el 13 de agosto de 2013, solicitud de patente provisional de los Estados Unidos N.º 61/869 279, presentada el 23 de agosto de 2013 y solicitud de patente provisional de los Estados Unidos N.º 61/887 112, presentada el 4 de octubre de 2013. Esta solicitud también está relacionada con la solicitud PCT N.º PCT/US2013/047079 presentada el 21 de junio de 2013, que reivindica prioridad en relación con la solicitud provisional de los Estados Unidos N.º 61/662 687, presentada el 21 de junio de 2012.

Antecedentes de la invención

Las enfermedades y trastornos inflamatorios son afecciones en las que una respuesta inflamatoria anómala o, de otra manera, desregulada, contribuye a la etiología o la gravedad de la enfermedad. Los ejemplos incluyen enfermedades autoinmunitarias tales como la diabetes de tipo 1 y la celiaquía.

Muchas de estas enfermedades se caracterizan por una infiltración de células mononucleares en un sitio de daño tisular u otra lesión. Como ejemplos de células mononucleares que se han observado en estas infiltraciones se incluyen linfocitos, especialmente linfocitos T y células del sistema fagocítico mononuclear (células SFM) tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas, células microgliales y otras.

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

Los monocitos de sangre periférica pueden clasificarse en uno de dos grupos según la expresión o no de ciertas moléculas de la superficie celular. En particular, se entiende que los "monocitos residentes" o "monocitos maduros" humanos tienen un fenotipo CD14^{lo}CD16⁺ (el equivalente en el ratón es CX₃CR1^{hi}CCR2^{Gr1}). Se sabe, que otro grupo de células, los "monocitos inflamatorios" o "monocitos inmaduros", tienen un fenotipo CD14⁺CD16⁻ (el equivalente en el ratón es CX₃CR1^{lo}CCR2^{Gr1}). (Geissmann F. et al. 2003 Immunity 19: 71-82)

Es importante destacar que, aunque se sabe que estos últimos son "inflamatorios" en el sentido de que se observa que migran hacia el tejido inflamado desde las células de sangre periférica derivadas de la médula ósea, no se ha demostrado que estas células causen inflamación ni directamente ni a través de la acción de otras células. Por otro lado, tampoco se ha demostrado que las diversas células del SFM que pueden formarse cuando estas células se diferencian, causen inflamación.

Las estrategias clínicas convencionales para la inmunosupresión general prolongada en trastornos asociados a una respuesta inmunitaria no deseada, se basan en la administración prolongada de fármacos inmunosupresores de acción amplia, por ejemplo, bloqueadores de señal 1 tales como ciclosporina A (CsA), FK506 (tacrolimus) y corticosteroides. El uso prolongado de altas dosis de estos fármacos puede tener efectos secundarios tóxicos. Por otra parte, incluso en aquellos pacientes que pueden tolerar estos fármacos, la necesidad de una terapia farmacológica inmunosupresora de por vida, conlleva un riesgo significativo de efectos secundarios graves, incluyendo tumores, infecciones graves, nefrotoxicidad y trastornos metabólicos.

Se han desarrollado métodos de inducción de tolerancia específica de antígeno, incluyendo el acoplamiento celular de un antígeno o péptido. Por ejemplo, en un método, la tolerancia acoplada a células inducida por péptidos, implicó la recogida, la separación y el tratamiento de células de sangre periférica con autoantígenos específicos de enfermedad y el reactivo de acoplamiento etilen carbodiimida (EDCI) en condiciones estériles, y la posterior reinfusión en el donante/paciente. Este proceso es costoso y debe llevarse a cabo en condiciones muy controladas por profesionales calificados y la cantidad de centros que pueden llevar a cabo el procedimiento es limitada. El uso de glóbulos rojos como el tipo de célula donante, amplía la posible fuente para incluir donantes alogénicos, lo que aumenta drásticamente el suministro de células originarias y posiblemente amplía el suministro de esta terapia a cualquier escenario autorizado para la transfusión de sangre. Estos planteamientos tienen limitaciones significativas en cuanto al suministro de células originarias y a la necesidad de compatibilizar el tipo de tejido para minimizar la respuesta inmunitaria a las células donantes. Además, el tratamiento local de las células para acoplar autoantígenos a través de EDCI (etilen carbodiimida) presenta una cuestión importante de control de calidad. Asimismo, estos planteamientos también requieren al menos algún conocimiento del antígeno patológico para el que se busca la inmunotolerancia.

Recientemente, se han descrito partículas acopladas a péptidos que eliminan la necesidad de suministrar células originarias y se ahorran la necesidad de los planteamientos anteriores de tener que tipificar los tejidos, Véase el documento WO 2010/085509. No obstante, el uso de antígenos acoplados al exterior de las partículas está asociado a un aumento de la anafilaxia y plantea cuestiones importantes sobre características químicas, fabricación y control.

De manera sorprendente, estos acontecimientos adversos se impiden cuando el antígeno está encapsulado en la partícula. Aún de manera más sorprendente, el tamaño y la carga pueden modificarse para mejorar la tolerancia a antígenos específicos.

5 Generalmente, la tolerancia específica de antígeno no es ideal porque generalmente no se conocen antígenos/epítomos específicos en enfermedades humanas. Asimismo, los antígenos pueden variar de un sujeto a otro para que un planteamiento específico de antígeno sea eficaz, por lo tanto, sería necesario determinar qué antígenos reconocerían a cada paciente individual, o sería necesario acoplar una biblioteca de posibles péptidos a las partículas antes de la administración. La síntesis y el acoplamiento individual de estos péptidos es lento y costoso. Por lo tanto, existe la necesidad de una terapia que resuelva ambos problemas, eliminando así la necesidad de una fuente de células que sea compatible con los tejidos.

Compendio de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

15 En algunos casos, la presente descripción proporciona composiciones (p. ej., para la inducción de tolerancia específica de antígeno) que comprenden una partícula transportadora (p. ej., una partícula de PLG) conectada a un péptido antigénico. En ciertas realizaciones, la partícula transportadora es una partícula de poli(láctido-co-glicólido) (PLG). En otras realizaciones, la partícula transportadora es una partícula de sulfuro de polipropileno estabilizado PLURIONICS®.

20 En algunos casos, la presente descripción proporciona composiciones que comprenden: un antígeno acoplado a una partícula transportadora con un potencial zeta negativo. En algunos casos de la descripción, el potencial zeta de la partícula es de aproximadamente -100 mV a aproximadamente 0 mV. En algunas realizaciones, el potencial zeta de la partícula es de aproximadamente -50 mV a aproximadamente -40 mV. En algunas realizaciones, la partícula es un copolímero que tiene una relación molar de aproximadamente 50:50, 80:20 a aproximadamente 100:0. En algunas realizaciones, la relación de los copolímeros puede ser, pero sin limitación, poliestireno: poli(vinil carboxilato)/80:20, poliestireno: poli(vinil carboxilato)/90:10, poli(vinil carboxilato): poliestireno/80:20, poli(vinil carboxilato): poliestireno/90:10, ácido poliláctico: ácido poliglicólico/80:20 o ácido poliláctico: ácido poliglicólico/90:10 o ácido poliláctico: ácido poliglicólico/50:50. No obstante, en otras realizaciones, la partícula es una partícula de poliestireno, una partícula de poliestireno carboxilado, una partícula de sulfuro de polipropileno estabilizado PLURIONICS® o una partícula de ácido poli(láctico-co-glicólico). En algunas realizaciones, la partícula es una partícula de ácido poli(láctico-co-glicólico).

30 La partícula tiene un diámetro promedio de entre 0,1 µm a 10 µm. En la invención, la partícula tiene un diámetro promedio de entre 0,2 µm a aproximadamente 2 µm. En algunos casos de la descripción, la partícula tiene un diámetro de entre aproximadamente 0,3 µm a aproximadamente 5 µm. En algunos casos de la descripción, la partícula tiene un diámetro de entre aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 3 µm. En algunas realizaciones, la partícula tiene un diámetro de entre aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 1 µm. En algunas realizaciones, la partícula tiene un diámetro de aproximadamente 0,5 µm.

40 En casos adicionales de la descripción, el antígeno comprende al menos una parte de un antígeno autoinmunitario, un antígeno expresado en un tejido que se va a trasplantar a un sujeto, una enzima o un alérgeno. En algunos casos de la descripción, el antígeno comprende al menos una parte de proteína básica de mielina, receptor de acetilcolina, antígeno endógeno, glucoproteína de mielina de oligodendrocitos, antígeno de células beta pancreáticas, insulina, proinsulina, proteína relacionada con la subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa específica de los islotes (IGRP, siglas del inglés *islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein*), ácido glutámico descarboxilasa (GAD, siglas del inglés *glutamic acid decarboxylase*), colágeno de tipo 11, gp39 de cartilago humano, fpl30-RAPS, proteína proteolipídica, fibrilarina, proteína nucleolar pequeña, receptor del factor estimulante de la tiroidea, histonas, glicoproteína gp70, piruvato deshidrogenasa dihidrolipoamida acetiltransferasa (PCD-E2), antígeno del folículo piloso, acuaporina 4, desmogleína 1, desmogleína 3, receptor nicotínico de acetilcolina, A-gliadina, y la isoforma 5 de tropomiosina humana, Polen de pasto bahía (BaGP, del inglés *bahia grass pollen*), alérgeno Pru p 3 del melocotón, alérgeno alfa-caseína s 1 de la leche, alérgeno Apig 1 del apio, alérgeno Bere 1 de las nueces de Brasil, alérgeno B-lactoglobulina de la leche, albúmina de suero bovino, alérgeno Cor a 1.04 de la avellana, alérgeno de ovoalbúmina de huevo, Advate, factor antihemofílico, Kogenato, Elocato, proteína recombinante de fusión de factor VIII y Fc, Refacto, Novo VIIa, factor VII recombinante, eptacog alfa, Helixato, Monanina, Factor de coagulación IX, Wilate, Ceredasa, Alglucerasa, Cerezima, Imiglucerasa, Elelso, taliglucerasa alfa, Fabrazima, Agalsidasa beta, Aldurazima, 1-iduronidasa, Miozima, Glucosidasa ácida, Elaprasa, iduronato-2-sulfatasa, Naglazima arilsulfatasa B o N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, terapias proteicas utilizadas en el reemplazo de enzimas o factores de coagulación tales como miozima, alglucerasa, imiglucerasa, taliglucerasa, agalsidasa beta, 1-iduronidasa, glucosidasa ácida, Iduronato-2-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, factor antihemofílico, factor VII, eptacog alfa, factor IX, miglustat, romiplastim, epotetina alfa, proteína C, laronidasa, lumizima o factor VIII.

55 En casos adicionales de la descripción, el antígeno comprende un antígeno autoinmunitario, un antígeno expresado en un tejido que se va a trasplantar a un sujeto, una enzima o un alérgeno. En casos de la descripción, el antígeno comprende, por ejemplo, proteína básica de mielina, receptor de acetilcolina, antígeno endógeno, glucoproteína de

mielina de oligodendrocitos, antígeno de células beta pancreáticas, insulina, ácido glutámico descarboxilasa (GAD, siglas del inglés *glutamic acid decarboxylase*), colágeno de tipo 11, gp39 de cartílago humano, fpl30-RAPS, proteína proteolípida, fibrilarina, proteína nucleolar pequeña, receptor del factor estimulante de la tiroides, histonas, glicoproteína gp70, piruvato deshidrogenasa dihidrolipoamida acetiltransferasa (PCD-E2), antígeno del folículo piloso, acuaporina 4, desmogleína 1, desmogleína 3, receptor nicotínico de acetilcolina, A-gliadina, y la isoforma 5 de tropomiosina humana, Polen de pasto bahía (BaGP), alérgeno Pru p 3 del melocotón, alérgeno alfa s 1 caseína de la leche, alérgeno Apig1 del apio, alérgeno Bere 1 de las nueces de Brasil, alérgeno B-lactoglobulina de la leche, albúmina de suero bovino, alérgeno Cor a 1.04 de la avellana, insulina, proinsulina, proteína relacionada con la subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa específica de los islotes (IGRP), alérgeno de ovoalbúmina de huevo, terapias proteicas utilizadas en el reemplazo de enzimas o factores de coagulación tales como miozima, alglucerasa, imiglucerasa, taliglucerasa, agalsidasa beta, 1-iduronidasa, glucosidasa ácida, Iduronato-2-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, factor antihemofílico, factor VII, eptacog alfa, factor IX, miglustat, romiplastim, epotetina alfa, proteína C, laronidasa, Lumizima Factor VIII.

En casos adicionales de la descripción, las partículas están acopladas a un antígeno que comprende uno o más epítomos. En un caso adicional de la descripción, el epítipo está asociado a una alergia, una enfermedad autoinmunitaria, una enzima utilizada en la terapia de reemplazo enzimático, enfermedad de almacenamiento lisosómico, o una enfermedad o un trastorno inflamatorio. En un caso de la descripción, el epítipo está asociado a diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, lupus sistémico, neuromielitis óptica, púrpura trombocitopénica idiopática, púrpura trombocitopénica trombótica, nefropatía membranosa, penfigoide ampolloso, pénfigo vulgar, miastenia grave, un trastorno de acumulación de mucopolisacáridos, gangliosidosis, hipofosfatasa alcalina, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, hiperuricemia, deficiencia de la hormona del crecimiento, anemia renal, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, enfermedad de Hurler, enfermedad de Hunter, enfermedad de Maroteaux-Lamy, hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, trombosis venosa, púrpura fulminante, mucopolisacaridosis VI, enfermedad de Pompe, celiaquía o enfermedad inflamatoria intestinal, incluyendo enfermedad de Crohn o colitis, p. ej., colitis ulcerosa. En un caso adicional de la descripción, los epítomos se encuentran en terapias proteicas utilizadas en el reemplazo de factores de coagulación o de enzimas, tales como, miozima, alglucerasa, imiglucerasa, taliglucerasa, agalsidasa beta, 1-iduronidasa, glucosidasa ácida, Iduronato-2-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, factor antihemofílico, factor VII, eptacog alfa, factor IX, miglustat, romiplastim, epotetina alfa, proteína C, laronidasa, Lumizima Factor VIII. En un caso adicional de la descripción, el epítipo es un epítipo descrito en las Tablas 2 o 3. En una realización de la invención, las partículas están acopladas a antígenos que comprenden solo un epítipo asociado a una enfermedad y/o trastorno. En una realización adicional de la invención, los antígenos comprenden más de un epítipo asociado a la misma enfermedad y/o trastorno. En una realización adicional de la invención, los antígenos comprenden más de un epítipo asociado a diferentes enfermedades y/o trastornos.

En algunos casos de la descripción, el antígeno está acoplado a dicha partícula mediante una molécula conjugada. En algunos casos de la descripción, el antígeno está acoplado a dicha partícula mediante un enlazador. En algunos casos de la descripción, la molécula conjugada es etilen carbodiimida (ECDI). En ciertos casos de la descripción, el antígeno está unido mediante un complejo de estreptavidina y biotina. En algunos casos de la descripción, los enlazadores pueden incluir, pero sin limitación, una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidioésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de bis-flúor activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento particulares incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

En algunos casos de la descripción, el antígeno está acoplado al exterior de la partícula con un potencial zeta negativo. En la invención, el antígeno se encapsula en la partícula que tiene un potencial zeta negativo en la superficie. En la invención, la partícula es biodegradable. En la invención, la partícula está funcionalizada en la superficie. En algunas realizaciones, la partícula está funcionalizada en la superficie con carboxilato.

En algunos casos, la presente descripción proporciona métodos para inducir tolerancia específica de antígeno en un sujeto que comprende: administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende una partícula acoplada a antígeno contra a dicho sujeto, en donde dicha partícula tiene un potencial zeta negativo, y en donde dicha partícula y antígeno inducen tolerancia de dicho antígeno en dicho sujeto. En algunos casos de la descripción, la administración se realiza para tratar o prevenir una enfermedad o afección. En algunos casos de la descripción, la administración se realiza antes o después del inicio de una enfermedad o afección causada por dicho antígeno. En algunos casos de la descripción, la enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en: una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una alergia, un rechazo de trasplante, una enfermedad de almacenamiento lisosómico, una deficiencia enzimática, una respuesta inflamatoria y una respuesta hiperinmunitaria. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en: esclerosis múltiple, diabetes de tipo 1, asma, una alergia alimentaria, una alergia ambiental, celiaquía, enfermedad inflamatoria intestinal, incluyendo enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, y una afección causada por dicho antígeno en dicho sujeto para reducir la reacción exagerada a dicho antígeno. En algunos casos de la descripción, los métodos comprenden además

repetir dicha administración de dicha composición en dicho sujeto.

En un caso adicional de la descripción, la administración de las partículas da como resultado la muerte de células T efectoras inducida por activación.

5 En un caso adicional de la descripción, la administración de las partículas da como resultado la anergia de células T efectoras.

En un caso adicional de la descripción, la administración de partículas da como resultado la apoptosis de células T efectoras.

En casos adicionales de la descripción, la administración de partículas da como resultado la transformación de células T efectoras en células T reguladoras.

10 En casos adicionales de la descripción, la administración de partículas da como resultado la inducción y expansión de células T reguladoras tanto específicas como inespecíficas de antígeno. En un caso adicional de la descripción, la administración de partículas da como resultado el aislamiento de células T efectoras en los ganglios linfáticos y el bazo, inhibiendo su capacidad de desplazarse a sitios periféricos y causar inflamación.

15 En un caso adicional de la descripción, la administración de partículas da como resultado la regulación negativa de la producción de anticuerpos dependientes de células T.

20 La presente invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de la celiaquía en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto, una cantidad eficaz de una composición que comprende una partícula acoplada a antígeno contra el sujeto, en donde la partícula tiene un potencial zeta negativo. El antígeno es gliadina o un epítipo de gliadina. En algunas realizaciones, el antígeno es uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1295-1724, SEQ ID NO: 1726-1766 y SEQ ID NO: 4986-5140. En algunos casos de la descripción, el antígeno es gliadina y la partícula acoplada al antígeno tiene un tamaño promedio posterior a la síntesis de aproximadamente 600-1500 nanómetros y una carga promedio posterior a la síntesis de aproximadamente -30 a aproximadamente -80 mV. En algunas realizaciones, la partícula tiene un tamaño promedio posterior a la síntesis de aproximadamente 600-1200 nanómetros y una carga promedio posterior a la síntesis de aproximadamente -40 a aproximadamente -70 mV. En ciertas realizaciones, la partícula tiene un tamaño promedio posterior a la síntesis de aproximadamente 600 micrómetro y una carga promedio posterior a la síntesis de aproximadamente -50 mV. En realizaciones adicionales, la partícula es una partícula de poliestireno, una partícula de poliestireno carboxilado, una partícula de sulfuro de polipropileno estabilizado PLURIONICS, o una partícula de ácido poli(láctico-co-glicólico).

25 En algunos casos, la presente descripción proporciona métodos para tratar la diabetes en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto, una cantidad eficaz de una composición que comprende una partícula acoplada a antígeno contra el sujeto, en donde la partícula tiene un potencial zeta negativo. En algunos casos de la descripción, la diabetes es diabetes de tipo I. En algunos casos de la descripción, la diabetes es diabetes de tipo II.

35 En algunos casos de la descripción, el antígeno es insulina, proinsulina, proteína relacionada con la subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa específica de los islotes (IGRP) o epítopos derivados de proinsulina precursora de insulina o de IGRP. En algunos casos de la descripción, el antígeno es uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1767-1840, SEQ ID NO: 1842-1962, SEQ ID NO: 1964-2027, SEQ ID NO: 2029-2073, SEQ ID NO: 2075-2113, SEQ ID NO: 2115-2197, SEQ ID NO: 2199-2248, SEQ ID NO: 2250-2259, SEQ ID NO: 2261-2420, SEQ ID NO: 2422-2486 y SEQ ID NO: 2489-2505. En algunos casos de la descripción, el antígeno es insulina y la partícula acoplada al antígeno tiene un tamaño promedio posterior a la síntesis de aproximadamente 300-800 nanómetros y una carga promedio posterior a la síntesis de aproximadamente -30 a aproximadamente -70 mV. En algunas realizaciones, la partícula tiene un tamaño promedio posterior a la síntesis de aproximadamente 350-600 nanómetros y una carga promedio posterior a la síntesis de aproximadamente -40 a aproximadamente -60 mV. En algunas realizaciones, la partícula tiene un tamaño promedio posterior a la síntesis de aproximadamente 500 nanómetros y una carga promedio posterior a la síntesis de aproximadamente -50 mV. En algunas realizaciones, el antígeno es proinsulina y la partícula acoplada a antígeno tiene un tamaño promedio posterior a la síntesis de aproximadamente 300-800 nanómetros y una carga promedio posterior a la síntesis de aproximadamente -30 a aproximadamente -70 mV. En ciertas realizaciones, la partícula tiene un tamaño promedio posterior a la síntesis de aproximadamente 400-600 nanómetros y una carga promedio posterior a la síntesis de aproximadamente -40 a aproximadamente -60 mV. En algunas realizaciones, la partícula tiene un tamaño promedio posterior a la síntesis de aproximadamente 570 nanómetros y una carga promedio posterior a la síntesis de aproximadamente -45 mV. En algunos casos de la descripción, el antígeno es IGRP y la partícula acoplada a antígeno tiene un tamaño promedio posterior a la síntesis de aproximadamente 300-800 nanómetros y una carga promedio posterior a la síntesis de aproximadamente -30 a aproximadamente -70 mV. En algunas realizaciones, la partícula tiene un tamaño promedio posterior a la síntesis de aproximadamente 400-700 nanómetros y una carga promedio posterior a la síntesis de aproximadamente -40 a aproximadamente -60 mV. En algunas realizaciones, la partícula tiene un tamaño promedio posterior a la síntesis de aproximadamente 600 nanómetros y una carga promedio posterior a la síntesis de aproximadamente -40 mV. En ciertas realizaciones, la partícula es una partícula de poliestireno, una partícula de poliestireno carboxilado, una partícula de sulfuro de polipropileno estabilizado PLURIONICS, o una partícula de ácido poli(láctico-co-glicólico).

En algunos casos, la presente descripción proporciona métodos de tratamiento de un sujeto que se somete a terapia de reemplazo enzimático, que comprende administrar a dicho sujeto, una cantidad eficaz de una composición que comprende una partícula acoplada a antígeno contra el sujeto, en donde la partícula tiene un potencial zeta negativo.

5 En algunos casos de la descripción, el sujeto se somete a terapia de reemplazo enzimático para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en hemofilia, hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, un trastorno de acumulación de mucopolisacáridos, gangliosidosis, hipofosfatasa alcalina, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, hiperuricemia, deficiencia de la hormona del crecimiento, anemia renal, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, enfermedad de Hurler, enfermedad de Pompe, enfermedad de Hunter y Maroteaux-Lary. En algunos casos de la descripción, la partícula acoplada al antígeno comprende una o más
10 enzimas seleccionadas del grupo que consiste en Advate, factor antihemofílico, Kogenato, Elocato, proteína recombinante de fusión de factor VIII y Fc, Refacto, Novo VIIa, factor VII recombinante, eptacog alfa, Helixato, Monanina, Factor de coagulación IX, Wilate, Ceredasa, Alglucerasa, Cerezima, Imiglucerasa, Eielso, taliglucerasa alfa, Fabrazima, Agalsidasa beta, Aldurazima, 1-iduronidasa, Miozima, Glucosidasa ácida, Elaprasa, iduronato-2-sulfatasa, Naglazima arilsulfatasa B y N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa. En algunas realizaciones, la partícula es una partícula de poliestireno, una partícula de poliestireno carboxilado, una partícula de sulfuro de polipropileno estabilizado PLURIONICS, o una partícula de ácido poli(láctico-co-glicólico). En ciertas realizaciones, la partícula es un copolímero que tiene una relación molar de aproximadamente 80:20 a aproximadamente 100:0. En ciertas realizaciones, la partícula es una partícula de poliestireno, una partícula de poliestireno carboxilado, una partícula de sulfuro de polipropileno estabilizado PLURIONICS, o una partícula de ácido poli(láctico-co-glicólico). En otras realizaciones, la
15 partícula es una partícula de ácido poli(láctico-co-glicólico) y tiene una relación de copolímero de ácido poliláctico:ácido poliglicólico de aproximadamente 50:50. En algunas realizaciones, la partícula es una partícula de ácido poli(láctico-co-glicólico) y tiene una relación de copolímero de ácido poliláctico:ácido poliglicólico de aproximadamente 50:50.

En un caso adicional de la descripción, la administración de las partículas de la invención previene la acumulación de neutrófilos y otros granulocitos en un sujeto. En un caso adicional de la descripción, las partículas de la invención se administran a un sujeto que tiene cáncer.
25

En un caso de la descripción, la administración de las partículas de la invención aumenta la regeneración del tejido dañado. En un caso adicional de la descripción, las partículas aumentan la regeneración de células epiteliales. En otro caso adicional de la descripción, las partículas aumentan la remielinización de las neuronas. En otro caso de la descripción, el sujeto tiene una enfermedad autoinmunitaria. En otro caso adicional de la descripción, el sujeto tiene enfermedad inflamatoria intestinal, incluyendo colitis ulcerosa y/o enfermedad de Crohn. En otro caso adicional de la descripción, el sujeto tiene esclerosis múltiple.
30

En algunos casos de la descripción, la composición se administra por vía intravenosa. En algunos casos de la descripción, la composición se administra por vía subcutánea, oral, intramuscular, intralinfática, portal o por aerosol. En un caso de la descripción, la administración de las partículas con carga negativa induce tolerancia específica de antígeno en un sujeto. En un caso de la descripción, las partículas que inducen tolerancia específica de antígeno comprenden uno o más epítomos asociados a una alergia, una enfermedad autoinmunitaria y/o una enfermedad inflamatoria. En un caso de la descripción, los epítomos se seleccionan de los descritos en las Tablas 2 o 3. En una realización de la invención, las partículas con carga negativa son poliestireno, diamante, sulfuro de polipropileno estabilizado PLURONICS® o partículas de ácido poli(láctico-co-glicólico). En una realización de la invención, las
35 partículas están carboxiladas. En un caso de la descripción, las partículas tienen un potencial zeta menor de aproximadamente -100 mV. En un caso de la descripción, las partículas tienen un potencial zeta entre aproximadamente -75 mV y 0 mV, por ejemplo, entre -50 mV y 0 mV o entre -100 mV y -50 mV o entre -75 mV y -50 mV o entre -50 mV y -40 mV. En un caso de la descripción, la partícula tiene un diámetro promedio de aproximadamente 0,1 µm a aproximadamente 10 µm, p. ej., de aproximadamente 0,2 µm a aproximadamente 2 µm o de aproximadamente 0,3 µm a aproximadamente 5 µm o de 0,5 µm a aproximadamente 3 µm o de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 1 µm.
40
45

En un caso de la descripción, el sujeto tiene una enfermedad autoinmunitaria. En un caso de la descripción, la enfermedad autoinmunitaria es esclerosis múltiple, esclerodermia, diabetes de tipo I, artritis reumatoide, tiroiditis, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjorgen, uveítis autoinmunitaria, miocarditis autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), lupus sistémico, neuromielitis óptica, púrpura trombocitopénica idiopática, púrpura trombocitopénica trombótica, nefropatía membranosa, penfigoide ampolloso, pénfigo vulgar, miastenia grave, celiaquía, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. En una realización de la invención, la partícula comprende un polipéptido de longitud completa o un fragmento del mismo. En un caso de la descripción, la partícula comprende uno o más epítomos de proteína básica de mielina. En un caso de la descripción, el epítomo de proteína básica de mielina es de la SEQ ID NO: 4975 o SEQ ID NO: 4976. En un caso de la descripción, las partículas comprenden uno o más epítomos de glucoproteína de mielina de oligodendrocitos. En un caso de la descripción, el epítomo de glucoproteína de mielina de oligodendrocitos es de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4978. En un caso de la descripción, la partícula contiene uno o más epítomos de insulina. En un caso de la descripción, el uno o más epítomos de insulina son de SEQ ID NO: 4981. En un caso de la descripción, la partícula comprende uno o más
50
55
60 epítomos de ácido glutámico descarboxilasa.

En un caso de la descripción, los epítomos de ácido glutámico descarboxilasa son de SEQ ID NO: 4982. En un caso de la descripción, la partícula contiene uno o más epítomos de proteínas proteolípicas. En un caso de la descripción,

el epítipo de proteína proteolipídica es de SEQ ID NO: 4977. En la invención, la partícula comprende uno o más epítopos de gliadina. En una realización de la invención, los epítopos de gliadina comprenden las SEQ ID NO: 4983-4985.

5 En algunos casos, la presente descripción proporciona además un proceso para la preparación de una partícula inmunitaria modificada con un potencial zeta negativo, comprendiendo dicho proceso: poner en contacto un precursor de partículas inmunomodificadas con una solución tampón en condiciones eficaces para formar la partícula inmunomodificada con un potencial zeta negativo. En algún caso de la descripción, el precursor de partículas inmunomodificadas se forma por copolimerización. En algunas realizaciones, la solución tampón tiene un pH básico.
10 En algún caso de la descripción, la solución tampón es bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio, bicarbonato de litio, dihidrogenofosfato de potasio, dihidrógenofosfato de sodio o dihidrógenofosfato de litio.

15 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición que comprende un antígeno encapsulado en el núcleo de un liposoma funcionalizado en la superficie. En una realización adicional, el liposoma está compuesto por fosfatidilcolina:fosfatidilglicerol:colesterol a una relación de 30:30:40. En otro caso adicional de la descripción, dicho antígeno comprende un antígeno autoinmunitario, un antígeno expresado en un tejido para ser trasplantado a un sujeto, o un alérgeno. En algunas realizaciones, la partícula es una partícula de ácido poli(láctico-co-glicólico) y tiene una relación de copolímero de ácido poliláctico:ácido poliglicólico de aproximadamente 50:50. En algunas realizaciones, las partículas comprenden PEMA. En algunas realizaciones, el PEMA está presente a aproximadamente de 0,1 % a aproximadamente 2,0 %.

Breve descripción de los dibujos

20 En la Figura 1 se muestra (A) una micrografía de una partícula de poli(láctido-co-glicólico) (PLG). En B y C se muestra la caracterización de partículas de poli(láctido-co-glicólico) funcionalizadas en la superficie mediante análisis de dispersión dinámica de luz, incluyendo la distribución de tamaño, el tamaño promedio (nm), el potencial ζ (mV) y eficacia de acoplamiento a péptidos (%) de péptidos OVA₃₂₃₋₃₃₉ y PLP₁₃₉₋₁₅₁ con partículas de PLG-PEMA. Las partículas de poli(láctido-co-glicólico) funcionalizadas en la superficie, se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS
25 (Malvern Instruments, Westborough, MA) a una velocidad de recuento de $2,5 \times 10^5$ cuentas por segundo en agua a 18,2 M Ω . La población de partículas de poli(láctido-co-glicólico) funcionalizadas en la superficie varió en un 5-15 % por lote, pero generalmente tenían un diámetro promedio Z de 567 nm, un diámetro pico de 670 nm y un índice de polidispersidad de 0,209.

30 En la figura 2 se muestra que las nanopartículas de PLG inducen tolerancia específica de antígeno. El epítipo PLP₁₃₉₋₁₅₁ de la proteína proteolipídica inmunodominante (PLG-PLP₁₃₉₋₁₅₁), se utilizó para inducir tolerancia para la prevención de la encefalitis autoinmunitaria experimental recidivante (EAE-R). Los ratones se trataron con PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLGA (N=5), OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLGA (N = 5) o PLGA no conjugado (N = 5) el día -7 en relación con el momento de la inmunización (día 0). Normalmente, el pico de la enfermedad se observó aproximadamente del día 12 al 14, y los ratones se puntuaron con respecto a la enfermedad clínica. Las partículas sin péptido, o modificadas con el péptido de control OVA₃₂₃₋₃₃₉,
35 no previnieron la inducción de la enfermedad. Sin embargo, de ninguna manera las partículas de PLGA modificadas con PLP₁₃₉₋₁₅₁ produjeron una puntuación clínica de 0 (sin enfermedad) exceptuando las puntuaciones clínicas bajas inferiores a 1 presentadas entre los días 20 y 30.

40 En la figura 3 se muestra que el tipo de partícula administrada tiene un efecto sobre el desarrollo de EAE en el modelo de ratón. A) muestra la puntuación clínica media y B) muestra la puntuación acumulativa media de los animales con EAE. Los ratones se trataron con OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLS (N=5), OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLGA_{phosphorex} (N=5), OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLGA_{PEMA} (N=5), PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLA (N=5), PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLGA_{phosphorex} (N=5) o PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG_{pema} (N=5) el día -7 en relación con el momento de la inmunización (día 0). Normalmente, el pico de la enfermedad se observó aproximadamente del día 12 al 14, y los ratones se puntuaron con respecto a la enfermedad clínica. Las partículas de cualquier composición, que se modificaron con el péptido de control OVA₃₂₃₋₃₃₉, no previnieron la inducción de la enfermedad. Sin embargo, las perlas de PLG acopladas a PLP₁₃₉₋₁₅₁ fueron más eficaces en la inducción de EAE-R por regulación negativa que
45 PLP₁₃₉₋₁₅₁ acoplada a PLG (phosphorex) comercial o a poliestireno.

En la figura 4 se muestra que los ratones tratados con OVA soluble el día 28 presentaron una disminución de la temperatura en comparación con la de los animales tratados con la partícula de PLG-OCVA. No se observó disminución de la temperatura corporal al cabo de 1 hora de suministrar las partículas.

50 En la figura 5 se muestra que la administración de PLP-PLG durante la remisión no da como resultado mortalidad asociada a anafilaxia. La EAE se indujo en ratones hembra SJL/J de seis a ocho semanas de vida mediante inyección subcutánea de PLP₁₃₉₋₁₅₁ en CFA, y el desarrollo de la enfermedad clínica se monitorizó y se registró (B). El día 21, en relación con la inducción de la enfermedad, los ratones recibieron inyecciones iv de PLP₁₃₉₋₁₅₁ soluble (cuadrados de color blanco), OVA₃₂₃₋₃₃₉ soluble (círculos de color blanco), o los mismos péptidos acoplados a nanopartículas de PLG (color negro). La temperatura de los animales se monitorizó y se registró cada 10 minutos durante 1 hora después de la inyección (A)

En la figura 6 se muestra la dosis óptima de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG administrado por vía intravenosa siete días antes de la inducción de la enfermedad. El desarrollo de la enfermedad clínica se midió en comparación con el de los ratones

5 SJL/J tratados con OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG (A). Ratones hembra SJL/J de seis a ocho semanas de vida recibieron inyección iv de nanopartículas de PLG acopladas o bien a PLP₁₃₉₋₁₅₁ (cuadrados) o a OVA₃₂₃₋₃₃₉ (círculos). La EAE se indujo por inyección subcutánea de PLP₁₃₉₋₁₅₁ en CFA 7 días (B), 25 días (C) o 50 días (D) después. Durante 100 días se efectuó un seguimiento de la enfermedad clínica de los animales del panel B. El día 8 en relación con la inducción de la enfermedad, se llevó a cabo una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH, siglas del inglés *delayed-type hypersensitivity*) en un subconjunto de los ratones mostrado en el panel B (E). Los oídos de los animales representativos seleccionados de los grupos sensibilizados con PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA en el panel B (OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG y PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG) se expusieron al epítipo PLP₁₃₉₋₁₅₁ y al péptido de control OVA₃₂₃₋₃₃₉. La inflamación de oídos, como medida de DTH, se determinó 24 h más tarde y se sustrajeron las respuestas antes de la exposición. Ratones hembra SJL/J de seis a ocho semanas de vida recibieron inyección por vía intravenosa de nanopartículas de PLG acopladas a PLP₁₇₈₋₁₉₁ (triángulos), OVA₃₂₃₋₃₃₉ (círculos) o PLP₁₃₉₋₁₅₁ (cuadrados), o solo de partículas no acopladas (círculos delineados) (F). La EAE se indujo 7 días después por inyección subcutánea de PLP₁₇₈₋₁₉₁ en CFA, y la enfermedad se monitorizó en los momentos mostrados.

15 En la figura 7A-D se muestra que la tolerancia profiláctica es más eficaz cuando las partículas de PLG-PLP₁₃₉₋₁₅₁ se administran por vía intravenosa o intraperitoneal. Los animales tratados con PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG administrado por vía intravenosa, no desarrollaron la enfermedad y la media de sus puntuaciones clínicas fue de 0 en la mayor parte de los momentos.

En la figura 8A-F se muestra que la administración de partículas de OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG inhibió las respuestas Th1 y Th17 en los animales tratados.

20 En la figura 9A-C se muestra una reducción en la infiltración de células inmunitarias en la médula espinal de los animales tratados con PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG que era más similar en el tejido natural que en el tejido de los animales tratados con OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG. La tinción de los animales tratados con OVA₃₂₃₋₃₃₉ fue positiva para CD45, CD4 y CD11b; mientras que la tinción de los animales tratados con PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG fue mínima para estos factores.

25 En la Figura 10A-C se muestra que la administración de partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG inhibe la alteración de la barrera hematoencefálica (BHE) y la activación de macrófagos en la médula espinal de los ratones tratados. Los animales se trataron con adyuvante completo de Freund (CFA, siglas del inglés *Complete Freund's Adjuvant*), con partículas de OVA₃₂₃₋₃₃₉ PLG o con partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG. Se determinaron las puntuaciones clínicas y el porcentaje de incidencia de EAE (B) y las médulas espinales se observaron obteniendo imágenes *in vivo* (A y C).

30 En las Figuras 11A y B se muestran las médulas espinales de los ratones tratados mediante obtención de imágenes *in vivo*. Los gráficos C-F muestran la cuantificación de los datos de las imágenes obtenidas.

En la Figura 12 se muestra que la administración de partículas de PLG, en las que se ha encapsulado PLP₁₃₉₋₁₅₁, inhibe la inducción de EAE-R en ratones. La capacidad para encapsular autoantígenos permite el uso de mezclas complejas de proteínas o incluso de homogeneizados de órganos que no son posibles con la unión a la superficie, permitiendo una mayor cobertura antigénica y, por lo tanto, abordar de manera más eficaz la propagación epitópica.

35 En la figura 13 se muestra que los animales tratados con partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG y con un anticuerpo anti CD25 demostraron, a veces, una puntuación clínica media más alta que la de los animales tratados con partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG y un anticuerpo de IgG de control.

40 En la figura 14 se muestra que la tolerancia terapéutica es inducida por partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG en EAE activa y adoptiva. La EAE adoptiva se indujo en ratones hembra SJL/J de seis a ocho semanas de vida, mediante transferencia adoptiva de $2,5 \times 10^6$ blastos activados con PLP₁₃₉₋₁₅₁. Los ratones recibieron inyección iv de PLP₁₃₉₋₁₅₁ (cuadrados) o de péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ (círculos) acoplado a nanopartículas de PLG de 500 nm 2 días (A), 14 días (C), 18 días (E) o 21 días (F) después de la inducción de la enfermedad. Las puntuaciones de enfermedad clínica se compararon con las que siguieron al tratamiento con esplenocitos acoplados a antígeno (A). El día 42, se extrajo el cerebro y la médula espinal de ratones tolerizados con PLP₁₃₉₋₁₅₁ o con OVA₃₂₃₋₃₃₉ para su análisis histológico. Secciones de ratones del panel A se tiñeron para la proteína PLP y CD45 (B). Las secciones de la médula espinal de los ratones del panel (C) se tiñeron con Luxol Fast Blue (D). Las zonas de desmielinización e infiltración celular se indican con flechas.

50 En la figura 15 se muestran gráficos que representan las puntuaciones clínicas medias de ratones con EAE activa y EAE adoptiva después del tratamiento con partículas de SP o PLG conjugadas con OVA₃₂₃₋₃₃₉ o PLP₁₃₉₋₁₅₁. Los ratones recibieron inyección iv de PLP₁₃₉₋₁₅₁-SP, PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG o de OVA₃₂₃₋₃₃₉-SP o de péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ PLG acoplado a nanopartículas de 500 nm 10 días (A) o 2 días (B) después de la inducción de la enfermedad y se determinó la puntuación clínica media. En ambos casos, la administración de partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PEG induce tolerancia en los ratones.

55 En la figura 16 se muestra que la infiltración de células inmunitarias al sistema nervioso central también se reduce drásticamente en ratones tolerizados (en los que se ha inducido tolerancia) con PLP-PLG. Ratones SJL/J recibieron inyección i.v. de nanopartículas de PLG 500 nm acopladas a PLP₁₃₉₋₁₅₁ (cuadrados) o a OVA₃₂₃₋₃₃₉ (círculos) 2 días después de la inducción de EAE por transferencia adoptiva. En el pico de la enfermedad (día 14), se extrajeron los cerebros y las médulas espinales y, a través de citometría de flujo, se hizo un recuento de la cantidad de linfocitos (B), CPA (C), microglia (D), células dendríticas periféricas (E), células dendríticas mieloides (F) y macrófagos (G). La

estrategia de selección de estas poblaciones se muestra en (A). Las preparaciones de células del SNC se estimularon con PMA e ionomicina durante 5 h antes de la tinción intracelular para IL-17A e IFN- γ (H).

5 En la figura 17 se muestra que la administración del péptido PLP₁₃₉₋₁₅₁ encapsulado en una partícula de PLG induce tolerancia cuando la partícula se administra con PBS. Sin embargo, la administración del anticuerpo anti PD-1 disminuye esta tolerancia.

En la figura 18 se muestra que la administración del péptido PLP₁₃₉₋₁₅₁ encapsulado en una partícula de PLG induce tolerancia cuando la partícula se administra con PBS. La administración de un anticuerpo anti CD40 disminuye esta tolerancia, pero esta disminución de tolerancia se invierte mediante la adición de un anticuerpo anti IL-12.

10 En la figura 19A-G se muestra que la administración profiláctica de OVA-PLG disminuyó la secreción de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, y redujo los niveles de OVA IgE y eosinófilos en suero en el pulmón.

15 En la figura 20 se muestra que la OVA encapsulada en partículas de PLG inhibe profilácticamente respuestas de memoria *in vitro* específicas de OVA de los ganglios linfáticos mediastínicos. La proliferación de ganglios linfáticos observada después de la reestimulación con OVA 25 μ g disminuye en los animales tratados con OVA-PLG (A). Además, el tratamiento con OVA-PLG disminuye la liberación de citocinas después de la reestimulación con OVA. Los niveles de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 disminuyen en ratones tratados con OVA-PLG (B).

En las figuras 21A y B se muestra que la administración terapéutica de OVA-PLG disminuyó la secreción de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, y redujo los niveles de OVA IgE y eosinófilos en suero en el pulmón.

20 En la figura 22 se muestra que la OVA encapsulada en partículas de PLG regula negativa y terapéuticamente citocinas Th2 específicas de OVA en el líquido de LBA (lavado broncoalveolar) mejor de lo que lo hacen las partículas de PLG acopladas a OVA. Los ratones se trataron con OVA/Alumbre por vía intraperitoneal a una dosis de 10 μ g/ratón el día 0 y el día 14. Los ratones recibieron por vía intravenosa una administración de partículas de PLG acopladas a OVA u OVA encapsulada en partículas PLG los días 28 y 42. Entre los días 56-58, los ratones se trataron tres veces con OVA en aerosol. Los gráficos muestran la secreción de citocinas cuando los animales se trataron con partículas de PLG acopladas a OVA (A) o con OVA encapsulada en partículas de PLG (B).

25 En la figura 23 se muestran los niveles de glucosa en sangre de animales con diabetes de tipo 1 después del tratamiento con partículas de p31-PLG. La administración de las partículas de PLG acopladas al péptido p31 dio como resultado niveles inferiores de glucosa en sangre en comparación con los observados después de la administración de las partículas acopladas al péptido MOG₃₅₋₅₅ (A y B). El porcentaje de células secretoras de IFN γ observado en los animales, también se redujo en los ratones tratados con p31-PLG en comparación con el de los ratones tratados con PLG-péptido MOG₃₅₋₅₅ (C).

30

En la figura 24A-B se muestra que la tolerancia inducida por p31-PLG requiere Tregs (células T reguladoras). La diabetes de tipo 1 se indujo en ratones mediante transferencia adoptiva. Dos horas después, las células activadas se transfirieron a los ratones NOD.SCID, los ratones se tolerizaron con partículas de p31-PLG o MOG₃₅₋₅₅-PLG. El empobrecimiento de Tregs anula la tolerancia inducida por la administración de partículas p31-PLG.

35 En la figura 25 se muestra que la administración de partículas de PLG acopladas a insulina aumentó significativamente el porcentaje de ratones que no desarrollaron diabetes durante 300 días (69,6 % en comparación con 22,7 %; $p=0,0027$). Ratones NOD (siglas del inglés *Non-obese diabetic*, diabéticos no obesos) se trataron con partículas de PLG acopladas a BSA (N=22) o a insulina (N=23) mediante administración intravenosa a las 6, 8 y 10 semanas de vida. Se evaluó el desarrollo de la diabetes en los ratones.

40 En la figura 26 se muestra el porcentaje de células donantes CD45.1 observado en los ratones receptores. El día -7 ratones hembra CD45.2 se tolerizaron con OVA-PLG o con Dby-PLG. El día 1, los ratones se irradiaron con 200 rads y después recibieron un trasplante de 1×10^6 , 5×10^6 o 1×10^7 células de médula ósea de ratones CD45.1 macho el día 0. Después, los ratones receptores se tolerizaron con OVA-PLG, Dby-SP o Dby-PLG el día 1 y se recogió sangre para análisis de quimerismo mediante FACS (siglas del inglés, *Fluorescence-Activated Cell Sorting*, clasificación de células activadas por fluorescencia).

45

En la figura 27 se muestra el porcentaje de células CD45.1 donantes observado en los ratones receptores después de la tolerización con OVA-PLG, Dby-SP o Dby-PLG el día 1. Un ratón de control positivo no demostró injertación significativa (~10 %). Ninguno de los ratones tratados de control negativo demostró injertación de células donantes. Un ratón tratado con Dby-SP no demostró injertación significativa (~10 %). Dos ratones tratados con OVA-PLG demostraron injertación de células donantes (~10 %): en un caso el rechazo fue completo a la semana 16. Un ratón tratado con Dby-PLG comenzó a rechazar a la semana 12 y el rechazo fue del 10 % a la semana 16. A la semana 16 la injertación del grupo tratado con Dby-PLG varió entre 10 % y 56 %. Los ratones tratados con OVA-PLG demostraron: 1) injertación espontánea, 2) homología de secuencias entre OVA323 y Dby o 3) propiedades tolerogénicas de las partículas. Dby-PLG permite mayor injertación que Dby-SP y OVA-PLG.

50

55 En la figura 28 se muestra que el ritmo de tolerancia tiene un efecto en el porcentaje de células CD45.1 en el ratón receptor. Los controles positivos muestran menor injertación (~4 %) de la esperada (~10 %). Un ratón de control

negativo tenía un 5 % de injertación De los 3 grupos tratados con OVA-PLG, un ratón del grupo del día -7, día +1 mostró injertación(12%). Desde el punto de vista clínico, la tolerancia el día 1 es más relevante que la tolerancia el día -7.

5 En la figura 29 se muestra que las partículas de PLGA teñidas con cumarina 6, que estaban acopladas a un antígeno o que carecían de antígeno, fueron detectables 3 horas después de la administración, pero no 24 horas después a la administración. Las partículas fueron detectables 3 horas después de la administración, pero no 24 horas después a la administración. Secciones de bazo (columna de la izquierda), hígado (columna central) y pulmón (columna de la izquierda) de ratón no tratado previamente (fila superior), que no recibió inyección, en comparación las de ratón al que se inyectó por vía i.v. micropartículas de PLGA/PEMA fluorescentes, 3 horas (fila central) y 24 horas (fila inferior) después de la inyección, se tiñeron con tinción de contraste DAPI.

10 En la figura 30 se muestra que las partículas de PLGA se localizan conjuntamente después de 6 y 15 horas con células F4/80⁺ en el hígado.

15 En la figura 31 se muestra que, 24 horas después de la infusión intravenosa, los macrófagos de la zona marginal absorben predominantemente partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁ acopladas marcadas con TAMRA. El porcentaje más alto de células PLP₁₃₉₋₁₅₁⁺ son macrófagos de la zona marginal.

En la Figura 32 se representa la puntuación clínica media diaria frente al número de días de sensibilización con PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA. La EAE-R inducida por PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA se inhibe en ratones SJL/J a través de la inducción de tolerancia inmunológica utilizando partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen PLP₁₃₉₋₁₅₁ soluble en sus núcleos.

20 En la figura 33 se muestra que los ratones tratados con OVA encapsulada-PLG mostraron la mayor reducción en la acumulación de eosinófilos.

En la figura 34 se muestra que los ratones tratados con OVA-PLG encapsulada mostraron la mayor reducción en los niveles de IgE en suero en comparación con los animales no tratados o tratados con control.

25 En la figura 35 se muestra la caracterización de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen PLP₁₃₉₋₁₅₁ soluble en sus núcleos mediante análisis de dispersión dinámica de luz. Las partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie, se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) a una velocidad de recuento de 1,792 x 10⁵ cuentas por segundo en agua a 18,2 MΩ. La población de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie tenía un diámetro Z promedio de 584 nm, un diámetro pico de 679 nm y un índice de polidispersidad de 0,162. Estos resultados son representativos de 6 lotes de síntesis, siguiendo el protocolo escrito anteriormente.

30 En la figura 36 se muestra la caracterización de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen PLP₁₃₉₋₁₅₁ soluble en sus núcleos mediante medición del potencial ζ. Las partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie, se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) a una velocidad de recuento de 6,67 x 10⁴ cuentas por segundo en agua a 18,2 Mw. La población de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie tenía un potencial ζ pico de -48,9 mV y una desviación ζ de 5,14 mV. Estos resultados son representativos de 6 lotes de síntesis, siguiendo el protocolo escrito anteriormente.

35 En la figura 37 se muestra la caracterización de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen ovoalbúmina soluble en sus núcleos mediante análisis de dispersión dinámica de luz. Las partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie, se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) a una velocidad de recuento de 1,822 x 10⁵ cuentas por segundo en agua a 18,2 Mw. La población de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie tenía un diámetro Z promedio de 569,7 nm, un diámetro pico de 700,3 nm y un índice de polidispersidad de 0,230. Estos resultados son representativos de 3 lotes de síntesis, siguiendo el protocolo escrito anteriormente.

40 En la figura 38 se muestra la caracterización de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen ovoalbúmina soluble en sus núcleos mediante medición del potencial ζ. Las partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie, se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) a una velocidad de recuento de 2,67 x 10⁴ cuentas por segundo en agua a 18,2 Mw. La población de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie tenía un potencial ζ pico de -52.2 mV y una desviación ζ de 5,38 mV. Estos resultados son representativos de 3 lotes de síntesis, siguiendo el protocolo escrito anteriormente.

45 En la figura 39 se muestra un gráfico que demuestra que los liposomas funcionalizados en la superficie que contienen péptido PLP₁₃₉₋₁₅₁ soluble en su núcleo inducen tolerancia inmunológica en el modelo murino de esclerosis múltiple. Los animales se trataron con liposomas funcionalizados en la superficie que contenían péptido PLP₁₃₉₋₁₅₁ soluble en sus núcleos (círculos) o con liposomas funcionalizados en la superficie que contenían péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ soluble (cuadrados). Las puntuaciones clínicas medias de los animales que recibieron los liposomas con péptido PLP₁₃₉₋₁₅₁ fueron inferiores a las de los animales que recibieron los liposomas con péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉.

En la figura 40 se muestra que la carga de la partícula administrada tiene un efecto sobre el desarrollo de EAE en el modelo de ratón. En el panel (A) se muestra la puntuación clínica media y en el panel (B) se muestra la puntuación acumulativa media de los animales con EAE. Los ratones recibieron TIMP (siglas del inglés, *tolerizing immune modifying particles*, partículas inmunomodificadoras tolerogénicas), que tenían una carga de -60 mv o -25 mv, conjugadas con un antígeno. Los ratones se trataron con OVA₃₂₃₋₃₃₉-TIMP_{-60 mv}, OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLGA_{-25 mv}, PLP₁₃₉₋₁₅₁-TIMP_{-60mv} o PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLGA_{-25mv} y la enfermedad clínica se puntuó. Las partículas con carga más negativa, TIMP_{-60mv}, inducen tolerancia de manera más eficaz que las partículas PLGA_{-25mv}.

En la figura 41 muestra que la carga de la partícula inmunomodificadora es importante para dirigir a la partícula inmunomodificadora a la célula presentadora de antígeno. Los animales de tipo silvestre o MARCO -/+ se trataron con PS-IMP o con vehículo. Los resultados indican que las partículas con una carga negativa reducida tienen una eficacia inferior porque hay menos interacción con el receptor captador MARCO (por sus siglas en inglés *macrophage receptor with collagenous structure*, receptor de macrófagos con estructura de colágeno) (A). El anticuerpo antiMARCO por sí solo no es capaz de proporcionar eficacia similar a la de PLGA IMP (B).

En la figura 42 se muestran los parámetros de partículas clave necesarias para la tolerancia en el modelo murino de EAE. En el panel (A) se muestra que el tamaño de partícula promedio más eficaz es de 500 nm. Los ratones se trataron con OVA₃₂₃₋₃₃₉-PSB 500 nm, PLP₁₃₉₋₁₅₁-PSB 100 nm, PLP₁₃₉₋₁₅₁-PSB 500 nm, PLP₁₃₉₋₁₅₁-PSB 1,75 µm o PLP₁₃₉₋₁₅₁-PSB 4,5 µm y se puntuó la enfermedad clínica. En el panel (B) se muestra que 24 horas después de la infusión iv, las partículas marcadas con fluorescencia con una relación de láctido:glucólido de 50:50, se han eliminado significativamente del bazo, hígado y pulmón.

En la figura 43 se demuestra que las TIMP con antígenos encapsulados son superiores a las partículas acopladas a péptidos. En el modelo de alergia murina, los animales se expusieron a OVA como un alérgeno, y después se trataron con PLG simulado, sin tratamiento, con una partícula de PLGA con OVA acoplada en el exterior de la partícula (A) o con una partícula de PLGA con OVA encapsulada dentro de la partícula (TIMP) (B) En el panel (A) se muestra que las partículas de PLG-OVA acopladas en la superficie no logran reducir la respuesta TH2. En el panel (B) se muestra que TIMP_{PEMA-60mv} (OVA encapsulada en la partícula) inhibe la respuesta TH2. En el panel (C) se muestra que TIMP_{PEMA-60mv} (OVA encapsulada en la partícula) inhibe respuestas de recuerdo.

Descripción detallada de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

Los presentes inventores han descubierto que nanopartículas acopladas a un antígeno pueden inducir tolerancia a enfermedades autoinmunitarias y disminuir la respuesta inmunitaria. Estas partículas pueden inducir tolerancia independientemente de si están unidas a la superficie de la partícula o encapsuladas en su interior. Por lo tanto, estas partículas, pueden ser útiles en el tratamiento de cualquier enfermedad o afección caracterizada por una respuesta inmunitaria inflamatoria excesiva, tal como ocurre en enfermedades autoinmunitarias o alergias.

"Partícula", como se emplea en esta memoria, se refiere a cualquier composición de materia no derivada de tejido, que puede ser una esfera o entidad similar a una esfera, perla o liposoma. El término "partícula", las expresiones "partícula inmunomodificadora" y "partícula transportadora" y el término "perla", pueden usarse indistintamente según el contexto. Adicionalmente, el término "partícula" puede usarse para abarcar perlas y esferas.

La expresión "partícula con carga negativa", como se emplea en esta memoria, se refiere a partículas que se hayan modificado para que posean una carga superficial neta que sea menor que cero.

Las "partículas carboxiladas" o "perlas carboxiladas" o "esferas carboxiladas", incluyen cualquier partícula que se haya modificado para que contenga un grupo carboxilo en su superficie. En algunas realizaciones, la adición del grupo carboxilo mejora la absorción de fagocitos/monocitos de las partículas en la circulación, p. ej., a través de la interacción con receptores captadores tales como MARCO. La carboxilación de las partículas puede realizarse usando cualquier compuesto que añada grupos carboxilo, incluyendo, pero sin limitación, poli(anhídrido maleico-etileno) (PEMA).

Un "resto antigénico", como se emplea en esta memoria, se refiere a cualquier resto, p. ej., un péptido, que el sistema inmunitario del hospedador reconoce. Los ejemplos de restos antigénicos incluyen, pero sin limitación, autoantígenos, enzimas y/o proteínas bacterianas o víricas, péptidos, fármacos o componentes. Sin quedar ligados a ninguna teoría, aunque las propias perlas carboxiladas pueden ser reconocidas por el sistema inmunitario, las perlas carboxiladas con nada más conectado a ellas, no se consideran un "resto antigénico" para los fines de la invención.

Las "perlas desnudas" o "partículas desnudas" o "esferas desnudas", como se emplea en esta memoria, se refiere a perlas, partículas o esferas que no se han carboxilado.

Los "mediadores proinflamatorios" o "polipéptidos proinflamatorios", como se emplea en esta memoria, se refiere a polipéptidos o fragmentos de los mismos que inducen, mantienen o prolongar la inflamación en un sujeto. Los ejemplos de mediadores proinflamatorios incluyen, pero sin limitación, citocinas y quimiocinas.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "monocito inflamatorio" se refiere a cualquier célula mielóide que exprese cualquier combinación de CD14/CD26 y CCR2.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "neutrófilo inhibitor" se refiere a neutrófilos y/o a células supresoras derivadas de monocitos.

5 Como se emplea en esta memoria, la expresión "célula Th" o "célula T auxiliar" se refiere a células CD4⁺. Las células T CD4⁺ ayudan a otros glóbulos blancos con procesos inmunológicos, incluyendo la maduración de células B en células plasmáticas y células B de memoria, y la activación de células T citotóxicas y macrófagos. Las células T se activan cuando las moléculas MHC de clase II les presentan antígenos peptídicos, que se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígeno (CPA).

10 Como se emplea en esta memoria, la expresión "célula Th1" se refiere a un subconjunto de células Th que producen mediadores proinflamatorios. Las células Th1 secretan citocinas para facilitar la respuesta inmunitaria y desempeñan un papel en la defensa del hospedador contra los patógenos, en parte actuando como mediadoras a la hora de reclutar neutrófilos y macrófagos en los tejidos infectados. Las células Th1 secretan citocinas, incluyendo IFN-gamma, IL2, IL-10 y TNF alfa/beta para coordinar la defensa contra patógenos intracelulares tales como virus y algunas bacterias.

15 Como se emplea en esta memoria, la expresión "célula Th2" se refiere a un subconjunto de células Th que actúan como mediadoras en la activación y el mantenimiento de la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos contra parásitos extracelulares, bacterias, alérgenos y toxinas. Las células Th2 actúan como mediadoras en estas funciones produciendo varias citocinas tales como IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 e IL-17E (IL-25) que son responsables de la producción de anticuerpos, activación de eosinófilos e inhibición de diversas funciones de macrófagos, proporcionando así respuestas protectoras independientes de fagocitos.

20 Como se emplea en esta memoria, la expresión "célula Th17" se refiere a un subconjunto de células Th. Las células Th17 secretan citocinas para facilitar la respuesta inmunitaria y desempeñan un papel en la defensa del hospedador contra los patógenos actuando como mediadoras a la hora de reclutar neutrófilos y macrófagos en los tejidos infectados. Las células Th17 secretan citocinas tales como IL17, IL21, IL22, IL24, IL26 y TNF alfa para coordinar la defensa contra patógenos extracelulares, incluidos hongos y bacterias.

25 "Acoplado", como se emplea en esta memoria, se refiere a un antígeno fijado en el exterior de una partícula o encapsulado en una partícula. Por tanto, un antígeno acoplado a una partícula incluye tanto el acoplamiento superficial como la encapsulación en la partícula.

30 El término "IMP" (siglas del inglés, *immune-modifying particles*), como se emplea en esta memoria, se refiere a partículas inmunomodificadoras que no están acopladas a un antígeno. El término "TIMP", como se emplea en esta memoria, se refiere a partículas inmunomodificadoras tolerogénicas que están acopladas a un antígeno. En algunos casos de la descripción, el antígeno está conectado a la superficie de la TIMP. En otras realizaciones, el antígeno está encapsulado en la TIMP.

35 La partícula puede tener cualquier forma o conformación de partícula. Sin embargo, en algunas realizaciones, se prefiere usar partículas que tengan menos probabilidades de aglutinarse *in vivo*. Son ejemplos de partículas dentro de estas realizaciones las que tienen una forma esférica.

40 Otro caso de la descripción está relacionado con una composición que comprende una partícula inmunomodificada que tiene un potencial zeta negativo y que carece de restos antigénicos. En una realización adicional, la invención proporciona composiciones que comprenden una partícula inmunomodificada con un potencial zeta negativo acoplada a un antígeno. En un caso adicional de la descripción, el antígeno está acoplado en el exterior de la partícula. En la invención, el antígeno está encapsulado en la partícula.

45 Otro caso más de la descripción está relacionado con un proceso para la preparación de una partícula inmunomodificada con un potencial zeta negativo y que carece de restos antigénicos. El proceso implica poner en contacto un precursor de partículas inmunomodificadas con una solución tampón en condiciones eficaces para formar la partícula inmunomodificada con un potencial zeta negativo. En algunos casos de la descripción, el precursor de partículas inmunomodificadas se forma mediante copolimerización. La microestructura de las partículas puede depender del método de copolimerización.

50 En algunos casos de la descripción, una molécula de péptido antigénico está acoplada a la partícula transportadora (p. ej., partícula inmunomodificada) mediante una molécula conjugada y/o un grupo enlazador. En algunos casos de la descripción, el acoplamiento del péptido antigénico y/o la molécula de señalización apoptótica con el transportador (p. ej., partícula de PLG) comprende una o más interacciones covalentes y/o no covalentes. En algunos casos de la descripción, el péptido antigénico está conectado a la superficie de la partícula transportadora con un potencial zeta negativo. En la invención, el péptido antigénico está encapsulado dentro de la partícula transportadora con un potencial zeta negativo.

55 En un caso de la descripción, la solución tampón en contacto con la partícula inmunomodificada puede tener un pH básico. Un pH básico adecuado para la solución básica incluye los siguientes valores 7,1, 7,5, 8,0, 8,5, 9,5, 10,0 10,5,

11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0 y 13,5. La solución tampón también puede prepararse con cualquier base adecuada y su conjugado. En algunos casos de la descripción, la solución tampón puede incluir, aunque sin limitación, bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio, bicarbonato de litio, dihidrogenofosfato de potasio, dihidrógeno fosfato de sodio, o dihidrógeno fosfato de litio y sus conjugados.

5 En una realización de la invención, las partículas inmunomodificadas contienen copolímeros. Estos copolímeros pueden tener una relación molar variable. La relación adecuada de copolímero de las partículas inmunomodificadas presentes puede ser de 25:75, 30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50, 55:45, 60:40, 65:35, 70: 30, 75:25, 80:20, 81:19, 82:18, 83:17, 84:16, 85:15, 86:14, 87:13, 88:12, 89:11, 90:10, 91:9, 92:8, 93:7, 94:6, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2, 99:1 o 100:0. En otra realización, el copolímero puede un copolímero periódico, estadístico, lineal, ramificado (incluyendo en forma de estrella, cepillo o peine). En algunas realizaciones, la relación de los copolímeros puede ser, pero sin limitación, poliestireno: poli(vinil carboxilato)/80:20, poliestireno: poli(vinil carboxilato)/90:10, poli(vinil carboxilato): poliestireno/80:20, poli(vinil carboxilato): poliestireno/90:10, ácido poliláctico: ácido poliglicólico/50:50, ácido poliláctico: ácido poliglicólico/80:20 o ácido poliláctico: ácido poliglicólico/90:10.

15 En un caso de la descripción, Las partículas de la invención se preparan añadiendo una composición que comprende el polímero (p. ej., PLGA) a una solución de poli(anhídrido maleico-etileno) (PEMA). La concentración de PEMA en la solución puede ser de entre aproximadamente 0,1 % y aproximadamente 10 %. En un caso de la descripción, la concentración de PEMA en la solución es de entre aproximadamente 0,2 % y aproximadamente 5 %. En otro caso de la descripción, la concentración de PEMA en la solución es de entre aproximadamente 0,1 % y 4 %. En otro caso de la descripción, la concentración de PEMA en la solución es de entre aproximadamente 0,1 % y 2 %. En otro caso de la descripción, la concentración de PEMA en la solución es de entre aproximadamente 0,5 % y 1 %. En un caso de la descripción, el porcentaje de PEMA en solución es de 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 %, 5 %, 6 %, 6,5 %, 7 %, 7,5 %, 8 %, 8,5 %, 9 %, 9,5 % o 10 %. En un caso de la descripción, el porcentaje de PEMA en solución es de aproximadamente 0,5 %. En otro caso de la descripción, el porcentaje de PEMA en solución es de aproximadamente 1,0 %. Otros compuestos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, poli(anhídrido maleico-*alt*-etileno), ácido poli(isobutileno-co-maleico), ácido poli(metil vinil éter-*alt*-maleico), éster monoetílico del ácido poli(metil vinil éter-*alt*-maleico), poli(anhídrido metil vinil éter-*alt*-maleico), poli(anhídrido metil vinil éter-*alt*-maleico) reticulado con polvo de 1,9-decadieno y/o sal sódica de ácido poli(maleico-*alt*-estireno).

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

No es necesario que cada partícula tenga un tamaño uniforme, aunque generalmente las partículas deben ser de un tamaño suficiente para ser secuestradas en el bazo o el hígado y desencadenar la fagocitosis o la captación a través del mecanismo mediador receptor o no receptor por una célula presentadora de antígeno, incluyendo células endoteliales u otras células del SFM. Preferiblemente, el tamaño de las partículas es microscópico o nanoscópico, para mejorar la solubilidad, impedir posibles complicaciones causadas por la agregación *in vivo* y para facilitar la pinocitosis. El tamaño de partícula puede ser un factor para la captación desde el espacio intersticial en zona de maduración de linfocitos. Una partícula que tiene un diámetro de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 10 μm es capaz de desencadenar la fagocitosis. Por tanto, en un caso de la descripción, la partícula tiene un diámetro dentro de estos límites. En otro caso de la descripción, la partícula tiene un diámetro promedio de aproximadamente 0,3 μm a aproximadamente 5 μm . En otros casos más de la descripción, la partícula tiene un diámetro promedio de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente 3 μm . En la invención, la partícula tiene un diámetro promedio de aproximadamente 0,2 μm a aproximadamente 2 μm . En un caso adicional de la descripción, la partícula tiene un tamaño promedio de aproximadamente 0,1 μm o de aproximadamente 0,2 μm o de aproximadamente 0,3 μm o de aproximadamente 0,4 μm o de aproximadamente 0,5 μm o de aproximadamente 1,0 μm o de aproximadamente 1,5 μm o de aproximadamente 2,0 μm o de aproximadamente 2,5 μm o de aproximadamente 3,0 μm o de aproximadamente 3,5 μm o de aproximadamente 4,0 μm o de aproximadamente 4,5 μm o de aproximadamente 5,0 μm . En una realización particular, la partícula tiene un tamaño medio de aproximadamente 0,5 μm . En algunas realizaciones, los pesos totales de las partículas son inferiores a aproximadamente 10 000 kDa, inferiores a aproximadamente 5 000 kDa o inferiores a aproximadamente 1 000 kDa, 500 kDa, 400 kDa, 300 kDa, 200 kDa, 100 kDa, 50 kDa, 20 kDa, 10 kDa. En una composición, el diámetro de las partículas no ha de ser uniforme. Como ejemplo, una formulación farmacéutica puede contener una pluralidad de partículas, algunas de las cuales son de aproximadamente 0,5 μm , mientras que otras son de aproximadamente 1,0 μm . Cualquier mezcla de tamaños de partícula dentro de estos intervalos dados será útil.

55 Las partículas de la presente descripción pueden poseer un potencial zeta particular. En ciertos casos de la descripción, el potencial zeta es negativo. En un caso de la descripción, el potencial zeta es inferior a aproximadamente -100 mV. En un caso de la descripción, el potencial zeta es inferior a aproximadamente -50 mV. En ciertos casos de la descripción, las partículas poseen un potencial zeta entre -100 mV y 0 mV. En un caso adicional de la descripción, las partículas poseen un potencial zeta entre -75 mV y 0 mV. En un caso adicional de la descripción, las partículas poseen un potencial zeta entre -60 mV y 0 mV. En un caso adicional de la descripción, las partículas poseen un potencial zeta entre -50 mV y 0 mV. En otro caso más de la descripción, las partículas poseen un potencial zeta entre -40 mV y 0 mV. En un caso adicional de la descripción, las partículas poseen un potencial zeta entre -30 mV y 0 mV.

En un caso adicional de la descripción, las partículas poseen un potencial zeta entre -20 mV y +0 mV. En un caso adicional de la descripción, las partículas poseen un potencial zeta entre -10 mV y -0 mV. En una realización de la invención, las partículas poseen un potencial zeta entre -100 mV y -50 mV. En otra realización particular, las partículas poseen un potencial zeta entre -75 mV y -50 mV. En una realización particular, las partículas poseen un potencial zeta entre -50 mV y -40 mV.

En algunos casos de la descripción, la carga de un transportador (p. ej., positiva, negativa, neutra) se selecciona para conferir beneficios específicos a la solicitud (p. ej., compatibilidad fisiológica, interacciones beneficiosas entre el péptido y la superficie, etc.). En algunos casos de la descripción, un transportador tiene una carga neta neutra o negativa (p. ej., para reducir la unión inespecífica con las superficies celulares que, en general, llevan una carga negativa neta). En ciertos casos de la descripción, los transportadores pueden conjugarse, directa o indirectamente, con un antígeno para el que se desea la tolerancia (también denominado en este documento péptido específico de antígeno, péptido antigénico, autoantígeno, antígeno inductor o antígeno tolerizante). En algunos casos, un transportador tiene múltiples sitios de unión (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10... 20... 50... 100 o más) para tener múltiples copias de un péptido específico de antígeno, o múltiples péptidos diferentes, expuestos en la superficie (p. ej., para aumentar la probabilidad de una respuesta de tolerancia). En algunas realizaciones, un transportador muestra un solo tipo de péptido antigénico. En algunas realizaciones, un transportador muestra múltiples péptidos antigénicos diferentes en la superficie. En algunos casos de la descripción, una superficie transportadora presenta grupos funcionales para la unión covalente de restos seleccionados (p. ej., péptidos antigénicos). En algunos casos de la descripción, los grupos funcionales de la superficie transportadora proporcionan sitios para la interacción no covalente con restos seleccionados (p. ej., péptidos antigénicos). En algunos casos de la descripción, un transportador tiene una superficie en la que se pueden adsorber restos de conjugación sin tener que formarse enlaces químicos.

El tamaño y la carga de las partículas son críticos para la inducción de tolerancia. Si bien las partículas diferirán en tamaño y carga según el antígeno encapsulado dentro de ellas (véase la Tabla 1 para ejemplos de partículas específicas), en general, las partículas de la presente descripción son eficaces para inducir tolerancia cuando están entre aproximadamente 100 nanómetros y aproximadamente 1500 nanómetros y tienen una carga de 0 a aproximadamente -70 mV. Las partículas de la invención son más eficaces para inducir tolerancia cuando tienen 400-800 nanómetros y tienen una carga de entre aproximadamente -25 mV y -70 mV. Asimismo, como se muestra en la Tabla 1, debido en parte a la concentración de las partículas y a la presencia de sacarosa y D-manitol en el proceso de liofilización, el tamaño promedio de partícula y la carga de las partículas pueden alterarse ligeramente en el proceso de liofilización, por lo tanto, más adelante se dan tanto los promedios posteriores a la síntesis como los promedios posteriores a la liofilización. Como se emplea en esta memoria, las expresiones "tamaño posterior a la síntesis" y "carga posterior a la síntesis", se refieren al tamaño y a la carga de la partícula antes de la liofilización. Las expresiones "tamaño posterior a la liofilización" y "carga posterior a la liofilización", se refieren al tamaño y a la carga de la partícula después de la liofilización.

35 TABLA 1 ANÁLISIS DE PARTÍCULAS REPRESENTATIVAS

Antígeno	Material de partícula	Relación de copolímero	Tensioactivo utilizado	Tamaño promedio posterior a la síntesis (posterior a la liofilización) nm	Carga promedio posterior a la síntesis (posterior a la liofilización) mV
OVA	PLGA (carboxilado)	50:50	PEMA	566,5 (538,5)	51,2 (66,0)
Insulina	PLGA (carboxilado)	50:50	PEMA	500,9 (385,2)	48,4 (53,7)
PLP _{139 151}	PLGA (carboxilado)	50:50	PEMA	429,9 (359,6)	53,7 (69,4)
Gliadina	PLGA (carboxilado)	50:50	PEMA	606,1 (1104,0)	48,8 (68,1)
Proinsulina	PLGA (carboxilado)	50:50	PEMA	566,6 (407,2)	44,1 (49,7)
Lisozima	PLGA (carboxilado)	50:50	PEMA	435,3 (393,3)	48,1 (65,1)
Antígeno	Material de partícula	Relación de copolímero	Tensioactivo utilizado	Tamaño promedio posterior a la síntesis (posterior a la liofilización) nm	Carga promedio posterior a la síntesis (posterior a la liofilización) mV
IGRP	PLGA (carboxilado)	50:50	PEMA	612,5 (399,3)	41,0 (57,6)
Partícula vacía (Sin As)	PLGA (carboxilado)	50:50	PEMA	383,9 (343,3)	52,6 (61,3)

En algunos casos de la descripción, la partícula no es metálica. En estos casos de la descripción, la partícula puede formarse a partir de un polímero. En la invención, la partícula es biodegradable en un individuo. En esta realización, las partículas pueden proporcionarse en un individuo a través de múltiples dosis sin que haya una acumulación de partículas en el individuo. Los ejemplos de partículas adecuadas incluyen partículas de poliestireno, partículas de PLGA, partículas de sulfuro de polipropileno estabilizadas con PLURIONICS y partículas de diamante.

Preferiblemente, la superficie de la partícula está compuesta de un material que minimiza las interacciones biológicas no específicas o no deseadas. Las interacciones entre la superficie de la partícula y el intersticio pueden ser un factor que juega un papel en la captación linfática. La superficie de la partícula puede recubrirse con un material para prevenir o disminuir las interacciones no específicas. La estabilización estérica recubriendo las partículas con capas hidrófilas, tales como poli(etilenglicol) (PEG) y sus copolímeros tales como PLURONICS® (incluidos los copolímeros de poli(etilenglicol)-*bl*-poli(propilenglicol)-*bl*-poli(etilenglicol)) puede reducir las interacciones no específicas con proteínas del intersticio, como lo demuestra la mejoría en la absorción linfática después de inyecciones subcutáneas. Todos estos hechos apuntan a la importancia de las propiedades físicas de las partículas en términos de absorción linfática. Para fabricar todos o algunos de los polímeros y/o partículas y/o capas pueden usarse polímeros biodegradables. Los polímeros biodegradables pueden experimentar degradación, por ejemplo, como resultado de grupos funcionales que reaccionan con el agua en la solución. El término "degradación", como se emplea en esta memoria, se refiere a volverse soluble, ya sea por reducción del peso molecular o por transformación de grupos hidrófobos en grupos hidrófilos. Generalmente, los polímeros con grupos éster están sujetos a hidrólisis espontánea, p. ej., los poliláctidos y poliglicólidos.

Las partículas de la presente invención también pueden contener componentes adicionales. Por ejemplo, los transportadores pueden tener agentes formadores de imágenes incorporados o conjugados con el transportador. Un ejemplo de una nanoesfera transportadora que tiene un agente formador de imágenes que actualmente está disponible en comercio es la nanoesfera Kodak X-sight. Nanocristales luminiscentes inorgánicos confinados cuánticamente, conocidos como puntos cuánticos (PC), han surgido como donadores ideales en aplicaciones FRET: su alto rendimiento cuántico y los cambios Stokes dependientes del tamaño ajustable permiten emitir diferentes tamaños de azul a infrarrojo cuando se excitan a una sola longitud de onda ultravioleta. (Bruchez, et al., *Science*, 1998, 281, 2013; Niemeyer, C. M *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 5796; Waggoner, A. *Methods Enzymol.* 1995, 246, 362; Brus, L. E. *J. Chem. Phys.* 1993, 79, 5566). En sistemas de marcaje biológico, formación de imágenes y biodetectores ópticos, pueden usarse puntos cuánticos, tales como puntos cuánticos orgánicos/inorgánicos híbridos basados en una clase de polímeros conocidos como dendrímeros. (Lemon, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 12886). A diferencia de la síntesis tradicional de puntos cuánticos inorgánicos, la síntesis de estas nanopartículas de puntos cuánticos híbridos no requiere altas temperaturas ni reactivos inestables sumamente tóxicos. (Etienne, et al., *Appl. Phys. Lett.* 87, 181913, 2005).

Las partículas se pueden formar a partir de una amplia gama de materiales. La partícula está compuesta preferiblemente de un material adecuado para su uso biológico. Por ejemplo, las partículas pueden estar compuestas de vidrio, sílice, poliésteres de ácidos hidroxycarboxílicos, polianhídridos de ácidos dicarboxílicos, o copolímeros de ácidos hidroxycarboxílicos y ácidos dicarboxílicos. Más generalmente, las partículas transportadoras pueden estar compuestas de poliésteres de alcanil, haloalquil, tioalquil, aminoalquil, aril, aralquil, alquenil, aralquenil, heteroaril o alcoxi hidroxi ácidos de cadena lineal o ramificada, sustituida o no sustituida, saturada o insaturada, lineal o reticulada o polianhídridos de ácidos alcanil, haloalquil, tioalquil, aminoalquil, aril, aralquil, alquenil, aralquenil, heteroaril o alcoxi dicarboxílicos de cadena lineal o ramificada, sustituida o no sustituida, saturada o insaturada, lineal o reticulada. Adicionalmente, las partículas transportadoras pueden ser puntos cuánticos o estar compuestas de puntos cuánticos, tales como partículas de poliestireno de puntos cuánticos (Joumaa et al. (2006) *Langmuir* 22: 1810-6). También se pueden emplear partículas transportadoras que incluyen mezclas de enlaces éster y anhídrido (p. ej., copolímeros de ácido glicólico y sebácico). Por ejemplo, las partículas transportadoras pueden comprender materiales que incluyen polímeros de ácido poliglicólico (PGA), polímeros de ácido poliláctico (PLA), polímeros de ácido polisebácico (PSA), copolímeros de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA o PLG; los términos son intercambiables), copolímeros de ácido poli(láctico-co-sebácico) (PLSA), copolímeros de ácido poli(glicólico-co-sebácico) (PGSA), polímeros de sulfuro de polipropileno, poli(caprolactona), quitosano, etc. Otros polímeros biodegradables y biocompatibles, útiles en la presente invención, incluyen polímeros o copolímeros de caprolactonas, carbonatos, amidas, aminoácidos, ortoésteres, acetales, cianoacrilatos y uretanos degradables, así como copolímeros de estos con ácidos alcanil, haloalquil, tioalquil, aminoalquil, alquenil, o hidroxi o dicarboxílicos aromáticos de cadena lineal o ramificada, sustituida o no sustituida. Además, los aminoácidos con grupos de cadena lateral reactivos, que desde el punto de vista biológico son importantes, tales como lisina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, tirosina y cisteína, o sus enantiómeros, puede incluirse en los copolímeros con cualquiera de los materiales mencionados anteriormente para proporcionar grupos reactivos para la conjugación con proteínas y péptidos antigénicos o restos de conjugación. Los materiales biodegradables adecuados para la presente invención incluyen diamante, PLA, PGA, sulfuro de polipropileno y polímeros de PLGA. En las partículas transportadoras de la descripción también pueden usarse materiales biocompatibles aunque no biodegradables. Por ejemplo, pueden emplearse polímeros de acrilatos no biodegradables, acetatos de etilen-vinilo, acetatos de celulosa sustituidos con acilo, uretanos no degradables, estirenos, cloruros de vinilo, fluoruros de vinilo, vinil imidazoles, olefinas clorosulfonadas, óxido de etileno, alcoholes vinílicos, TEFLON® (DuPont, Wilmington, Del.) y nailon.

Las partículas de la presente invención pueden fabricarse mediante cualquier medio comúnmente conocido en la técnica. Como ejemplos de métodos de fabricación de partículas se incluyen, pero sin limitación, polimerización en microemulsión, polimerización interfacial, polimerización por precipitación, evaporación de emulsión, difusión de emulsión, desplazamiento de solventes y desalinización (Astete y Sabliov, J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 17:247-289(2006)). La manipulación del proceso de fabricación de partículas de PLGA puede controlar las propiedades de las partículas (p. ej., tamaño, distribución de tamaño, potencial zeta, morfología, hidrofobicidad/hidrofiliidad, atrapamiento de polipéptidos, etc.). El tamaño de la partícula está influenciado por diversos factores incluyendo, pero sin limitación, la concentración de PLGA, el disolvente utilizado en la fabricación de la partícula, la naturaleza de la fase orgánica, los tensioactivos utilizados en la fabricación, la viscosidad de la fase continua y discontinua, la naturaleza del disolvente utilizado, la temperatura del agua utilizada, el ultrasonidos, la tasa de evaporación, los aditivos, la tensión de cizalla, la esterilización, y la naturaleza de cualquier antígeno o polipéptido encapsulado.

El tamaño de partícula se ve afectado por la concentración de polímero; a partir de concentraciones de polímeros más altas se forman partículas más grandes. Por ejemplo, cuando se usa el disolvente carbonato de propileno, un aumento en la concentración de PLGA de 1 % a 4 % (p/v) puede aumentar el tamaño medio de partícula de aproximadamente 205 nm a aproximadamente 290 nm. Como alternativa, en acetato de etilo y Pluronic F-127 al 5 %, un aumento en la concentración de PLGA de 1 % a 5 % (p/v) aumenta el tamaño medio de partícula de 120 nm a 230 nm.

La viscosidad de la fase continua y discontinua también es un parámetro importante que afecta al proceso de difusión, una etapa clave en la formación de partículas más pequeñas. El tamaño de las partículas aumenta con un aumento en la viscosidad de la fase dispersa, mientras que el tamaño de las partículas disminuye con una fase continua más viscosa. En general, cuanto menor es la relación de fase de disolvente orgánico a acuoso menor es el tamaño de partícula.

La agitación y velocidad del homogeneizador también afectan al tamaño de partícula; en general, mayores velocidades y agitación causan una disminución en el tamaño de partícula, aunque hay un punto en donde los aumentos adicionales de velocidad y agitación ya no disminuyen el tamaño de partícula. Hay un impacto favorable en la reducción de tamaño cuando la emulsión se homogeneiza con un homogeneizador de alta presión en comparación con solo alta agitación. Por ejemplo, a una relación de fase del 20 % en PVA al 5 %, el tamaño medio de partícula con agitación es de 288 nm y el tamaño medio de partícula con homogeneización (alta presión de 300 bares) es de 231 nm.

Se puede lograr una reducción importante del tamaño de las partículas variando la temperatura del agua añadida para mejorar la difusión del disolvente. El tamaño medio de partícula disminuye con un aumento en la temperatura del agua.

La naturaleza del polipéptido encapsulado en la partícula también afecta al tamaño de partícula. En general, la encapsulación de polipéptidos hidrófobos conduce a la formación de partículas más pequeñas en comparación con la encapsulación de polipéptidos más hidrófilos. En el proceso de doble emulsión, el atrapamiento de polipéptidos más hidrófilos se mejora usando PLGA de alta masa molecular y una alta masa molecular del primer tensioactivo que causa una mayor viscosidad de fase interna. La interacción entre el disolvente, el polímero y el polipéptido afecta a la eficacia de incorporar el polipéptido en la partícula.

La masa molecular de PLGA impacta el tamaño de partícula medio final. En general, cuanto mayor sea la masa molecular mayor será el tamaño medio de partícula. Por ejemplo, dado que la composición y la masa molecular del PLGA varía (p. ej., de 12 a 48 kDa para 50: 50 PLGA; de 12 a 98 kDa para 75: 25 PLGA) el tamaño medio de partícula varía (de aproximadamente 102 nm a 154 nm; de aproximadamente 132 nm a 152 nm respectivamente). Incluso cuando las partículas tienen la misma masa molecular, su composición puede afectar al tamaño promedio de partícula; por ejemplo, las partículas con una relación de 50: 50 generalmente forman partículas más pequeñas que las que tienen una relación de 75: 25. Los grupos finales en el polímero también afectan al tamaño de partícula. Por ejemplo, las partículas preparadas con grupos terminales de éster forman partículas con un tamaño promedio de 740 nm (PI=0,394) en comparación con el tamaño medio para el grupo terminal ácido del PLGA que es de 240 nm (PI=0,225).

El disolvente usado también puede afectar al tamaño de partícula; los disolventes que reducen la tensión superficial de la solución también reducen el tamaño de partícula.

El disolvente orgánico se elimina por evaporación al vacío para impedir daños en los polímeros y polipéptidos y para promover la reducción final del tamaño de partícula. La evaporación del disolvente orgánico al vacío es más eficaz en la formación de partículas más pequeñas. Por ejemplo, la evaporación al vacío produce un tamaño medio de partícula de aproximadamente 30 % más pequeño que el tamaño medio de partículas producido a una velocidad de evaporación normal.

La amplitud de la longitud de onda ultrasonido también afecta a las características de las partículas. La amplitud de la longitud de onda debe ser superior al 20 % con 600 a 800 s de ultrasonido para formar miniemulsiones estables sin más cambios en el tamaño de las gotas. Sin embargo, el principal inconveniente del ultrasonidos es la falta de monodispersidad de la emulsión formada.

Las fases orgánicas que pueden usarse en la producción de las partículas de la invención incluyen, pero sin limitación, acetato de etilo, metil etil cetona, carbonato de propileno y alcohol bencílico. Las fases continuas que pueden usarse, incluyen, pero sin limitación, el tensioactivo poloxamer 188.

- En la fabricación de las partículas de la invención puede usarse una variedad de tensioactivos. El tensioactivo puede ser aniónico, catiónico o no iónico. Habitualmente, en la síntesis de partículas se usan tensioactivos de la familias de poloxámeros y poloxaminas. Los tensioactivos que pueden usarse, incluyen, pero sin limitación, PEG, Tween-80, gelatina, dextrano, pluronic L-63, PVA, metilcelulosa, lecitina y DMAB. Adicionalmente, los tensioactivos biodegradables y biocompatibles incluyen, pero sin limitación, vitamina E TPGS (succinato de D- α -tocoferil polietilenglicol 1000). En ciertos casos de la descripción, se necesitan dos tensioactivos (p. ej., en el método de evaporación de doble emulsión). Estos dos tensioactivos pueden incluir un tensioactivo hidrófobo para la primera emulsión y un tensioactivo hidrófobo para la segunda emulsión.
- Los disolventes que pueden usarse en la producción de las partículas de la invención incluyen, pero sin limitación, acetona, tetrahidrofurano (THF), cloroformo, y miembros de la familia de compuestos clorados, cloruro de metilo. La elección de solventes orgánicos requiere dos criterios de selección: el polímero debe ser soluble en este disolvente y el disolvente debe ser completamente inmiscible con la fase acuosa.
- Las sales que pueden usarse en la producción de las partículas de la invención incluyen, pero sin limitación, cloruro de magnesio hexahidratado, acetato de magnesio tetrahidratado.
- Los agentes desalinizantes comunes incluyen, pero sin limitación, electrolitos (p. ej., cloruro de sodio, acetato de magnesio, cloruro de magnesio) o no electrolitos (p. ej., sacarosa).
- La estabilidad y el tamaño de las partículas de la invención pueden mejorarse añadiendo compuestos que incluyen, pero sin limitación, ácidos grasos o cadenas cortas de carbonos. La adición de la cadena de carbono más larga del ácido láurico está asociada a la mejora de las características de las partículas. Asimismo, la adición de aditivos hidrófobos puede mejorar el tamaño de partícula, la incorporación del polipéptido en la partícula y el perfil de liberación. Las preparaciones de partículas pueden estabilizarse por liofilización. La adición de un crioprotector, tal como trehalosa, puede disminuir la agregación de las partículas después de la liofilización.
- Perlas adecuadas que actualmente están disponibles en el comercio incluyen perlas de poliestireno tales como FluoSpheres (Molecular Probes, Eugene, Oreg.).
- En algunos casos, la presente descripción proporciona sistemas que comprenden: (a) un armazón de suministro configurado para el suministro de agentes químicos y/o biológicos a un sujeto; y (b) partículas de poli(láctido-co-glicólido) acopladas a antígeno para la inducción de tolerancia específica de antígeno. En algunos casos de la descripción, al menos una parte de dicho armazón de suministro es microporosa. En algunos casos de la descripción, las partículas de poli(láctido-co-glicólido) acopladas a antígeno están encapsuladas en dicho armazón. En algunos casos de la descripción, los agentes químicos y/o biológicos se seleccionan del grupo que consiste en: proteínas, péptidos, moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, células y partículas. En algunos casos de la descripción, los agentes químicos y/o biológicos comprenden células, y dichas células comprenden células de los islotes pancreáticos.
- Las propiedades físicas también están relacionadas con la utilidad de una nanopartícula después de la absorción y retención en zonas que tienen linfocitos inmaduros. Estas incluyen propiedades mecánicas tales como rigidez o gomosidad. Algunas realizaciones se basan en un núcleo gomoso, p. ej., un núcleo de poli(sulfuro de propileno) (PPS) con una capa superpuesta, p. ej., una capa superpuesta hidrófila, como en PEG, como en el sistema PPS-PEG recientemente desarrollado y caracterizado para el suministro sistémico (pero no dirigido o inmunitario). El núcleo gomoso está en contraste con un núcleo sustancialmente rígido como en un sistema de nanopartículas metálicas o de poliestireno. El término gomoso se refiere a ciertos materiales elásticos además de los cauchos naturales o sintéticos, siendo el caucho un término conocido para los expertos en la técnica de polímeros. Por ejemplo, el PPS reticulado puede usarse para formar un núcleo de caucho hidrófobo. El PPS es un polímero que se degrada en condiciones oxidativas a polisulfóxido y finalmente a polisulfona, pasando de un polímero de caucho hidrófobo a uno hidrófilo soluble en agua. Para su uso, se pueden adaptar otros polímeros de sulfuro, refiriéndose la expresión polímero de sulfuro a un polímero con un azufre en el armazón del oligómero. Otros polímeros gomosos que pueden usarse son poliésteres con una temperatura de transición vítrea en condiciones hidratadas que es inferior a aproximadamente 37 °C. Ventajosamente puede usarse un núcleo hidrófobo con una capa superpuesta hidrófila ya que el núcleo y la capa superpuesta tenderán a no combinarse, de modo que la capa superpuesta tiende a expandirse estéricamente lejos del núcleo. Un núcleo se refiere a una partícula que tiene una capa encima. Una capa se refiere a un material que cubre al menos una parte del núcleo. Una capa puede adsorberse o unirse de manera covalente. Una partícula o un núcleo puede ser sólida(o) o hueca(o). Los núcleos gomosos hidrófobos son ventajosos sobre los núcleos hidrófobos rígidos, tales como núcleos cristalinos o vítreos (como en el caso del poliestireno), ya que las partículas con núcleos gomosos hidrófobos pueden transportar cargas más altas de fármacos hidrófobos.
- Otra propiedad física es la hidrofilia de la superficie. Un material hidrófilo puede tener una solubilidad en agua de al menos 1 gramo por litro cuando no está reticulado. La estabilización estérica de partículas con polímeros hidrófilos puede mejorar la absorción del intersticio al reducir las interacciones no específicas; sin embargo, la naturaleza invisible aumentada de las partículas también puede reducir la internalización por células fagocíticas en zonas que tienen linfocitos inmaduros. Sin embargo, el reto de equilibrar estas características competitivas se ha cumplido y esta solicitud documenta la creación de nanopartículas para un suministro linfático eficaz a las CD y a otras CPA en los ganglios linfáticos. Algunas realizaciones incluyen un componente hidrófilo, p. ej., una capa de material hidrófilo. Son

ejemplos de materiales hidrófilos adecuados uno o más de óxidos de polialquileño, óxidos de polietileno, polisacáridos, ácidos poliacrílicos y poliéteres. El peso molecular de los polímeros en una capa se puede ajustar para proporcionar un grado útil de impedimento estérico *in vivo*, p. ej., de aproximadamente 1 000 a aproximadamente 100 000 o incluso más; los expertos apreciarán de inmediato que se contemplan todos los intervalos y valores dentro de los intervalos explícitamente establecidos, p. ej., entre 10 000 y 50 000.

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

Para conjugar proteínas y péptidos antigénicos con transportadores, puede usarse una gran variedad de medios muy conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen cualquiera de las características químicas convencionales que no destruyan o limiten gravemente la actividad biológica de las proteínas y de los péptidos antigénicos, y que permita que un número suficiente de proteínas y péptidos antigénicos se conjugue con el transportador en una orientación que permita la interacción de la proteína o del péptido antigénico con un receptor de células T análogo. Generalmente, se prefieren métodos que conjugan las regiones C-terminales de una proteína o péptido antigénico, o las regiones C-terminales de una proteína de fusión peptídica o proteica, con material sustentador. Las características químicas exactas dependerán, por supuesto, de la naturaleza del material sustentador, de la presencia o ausencia de fusiones C-terminales con la proteína o péptido antigénico y/o de la presencia o ausencia de restos de conjugación.

Los grupos funcionales pueden ubicarse en la partícula según sea necesario para la disponibilidad. Una ubicación puede ser como grupos laterales o terminales en el núcleo del polímero o polímeros que son capas en un núcleo o polímeros conectados de otra manera con la partícula. Por ejemplo, en el presente documento se incluyen ejemplos que describen que el PEG que estabiliza las nanopartículas se puede funcionalizar fácilmente para el direccionamiento específico de células o el suministro de fármacos proteicos y peptídicos.

Conjugados tales como etilen carbodiimida (ECDI), hexameten diisocianato, di-glicidiléter de propilenglicol, que contiene 2 residuos epoxídicos, y la epiclorhidrina, pueden usarse para la fijación de péptidos o proteínas a la superficie del transportador. Sin quedar ligados a ninguna teoría, se sospecha que la ECDI desempeña dos funciones principales para la inducción de tolerancia: (a) acopla químicamente las proteínas/péptidos a la superficie celular mediante catálisis de la formación de enlaces peptídicos entre grupos amino y carboxilo libres; y (b) induce al transportador a imitar la muerte celular apoptótica de modo que sean recogidos por las células presentadoras de antígeno del hospedador (que pueden incluir células endoteliales) en el bazo e induzcan tolerancia. Es esta presentación a las células T hospedadoras, de una manera no inmunogénica, la que conduce a la inducción directa de anergia en células autorreactivas. Además, la ECDI sirve como un fuerte estímulo para la inducción de células T reguladoras específicas.

En una serie de casos de la descripción, las proteínas y péptidos antigénicos se unen al transportador a través de un enlace químico covalente. Por ejemplo, un grupo o resto reactivo cerca del extremo C-terminal del antígeno (p. ej., el grupo carboxilo C-terminal, o un grupo hidroxilo, tiol o amina de una cadena lateral de aminoácidos) se puede conjugar directamente con un grupo o resto reactivo en la superficie del transportador (p. ej., un grupo hidroxilo o carboxilo de un polímero de PLA o PGA, un grupo amina o carboxilo terminal de un dendrímero, o un grupo hidroxilo, carboxilo o fosfato de un fosfolípido) por reacción química directa. Como alternativa, puede haber un resto de conjugación que se conjuga de manera covalente tanto con las proteínas y los péptidos antigénicos como con el transportador, uniéndolos por tanto entre sí.

Los grupos carboxilo reactivos en la superficie de un transportador pueden unirse a aminas libres (p. ej., de residuos de Lys) en la proteína o péptido antigénico, haciéndolos reaccionar, p. ej., con hidrocloreto de 1-etil-3-[3,9-dimetil aminopropil] carbodiimida (EDC) o con éster de N-hidroxisuccinimida (NHS). De manera similar, la misma química puede usarse para conjugar aminas libres en la superficie de un transportador con carboxilos libres (p. ej., del extremo C, o de los residuos Asp o Glu) en la proteína o péptido antigénico. Como alternativa, los grupos amina libres en la superficie de un transportador pueden unirse de manera covalente a proteínas y péptidos antigénicos, o a proteínas de fusión de proteínas o péptidos antigénicos, utilizando química sulfo-SIAB, esencialmente como describen Arano et al. (1991) Chem. 2:71-6.

En otro caso de la descripción, un enlace no covalente entre un ligando unido a la proteína o péptido antigénico y un antiligando conectado al transportador puede conjugar el antígeno con el transportador. Por ejemplo, una etiqueta de secuencia de reconocimiento de biotina ligasa puede unirse al extremo C de una proteína o péptido antigénico, y esta etiqueta puede biotinilarse mediante biotina ligasa. Después, la biotina puede servir como un ligando para conjugar de manera no covalente la proteína o péptido antigénico con avidina o estreptavidina que se adsorbe o se une, de otra manera, a la superficie del transportador como un antiligando. Como alternativa, si las proteínas y los péptidos antigénicos se fusionan con un dominio de inmunoglobulina que lleva una región Fc, como se ha descrito anteriormente, el dominio Fc puede actuar como un ligando y la proteína A, unida de manera covalente o no covalente a la superficie del transportador, puede servir como el antiligando para conjugar de manera no covalente la proteína o péptido antigénico con el transportador. En la técnica se conocen bien otros medios que pueden emplearse para conjugar de manera no covalente proteínas y péptidos antigénicos con transportadores, incluyendo técnicas de quelación de iones metálicos (p. ej., usando una etiqueta de poli-His en el extremo C de la proteína o péptido antigénico

o proteínas de fusión de proteínas o péptidos antigénicos, y un transportador revestido con Ni⁺), y estos métodos pueden sustituirse por los descritos en el presente documento.

La conjugación de un resto de ácido nucleico con una molécula plataforma se puede efectuar de varias maneras, normalmente involucrando uno o más agentes y grupos funcionales reticulantes en el resto de ácido nucleico y la molécula plataforma. Los grupos enlazadores se añaden a las plataformas utilizando técnicas convencionales de química sintética. Se pueden añadir grupos enlazadores a restos de ácido nucleico usando técnicas convencionales sintéticas. El facultativo dispone de diversas opciones para los antígenos utilizados en las combinaciones de esta invención. El antígeno inductor presente en la combinación contribuye a la especificidad de la respuesta tolerogénica que se induce. Este puede ser igual o no al antígeno diana, que es el antígeno presente, o que se colocará en el sujeto que se está tratando, que es una diana para la respuesta inmunológica no deseada y para la que se desea tolerancia.

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

En algunos casos, la presente descripción proporciona un transportador (p. ej., una partícula inmunomodificadora) acoplado a uno o más péptidos, polipéptidos y/o proteínas. En algunos casos de la descripción, un transportador (p. ej., un transportador de PLG), tales como los descritos en la presente memoria, son eficaces para inducir tolerancia específica de antígeno y/o prevenir la aparición de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario (tal como EAE en un modelo de ratón) y/o disminuir la gravedad de una enfermedad preexistente relacionada con el sistema inmunitario. En algunos casos de la descripción, las composiciones y los métodos de la presente invención pueden hacer que las células T emprendan sucesos tempranos asociados a la activación de las células T, pero no permiten que las células T adquieran la función efectora. Por ejemplo, la administración de las composiciones de la presente descripción puede dar como resultado células T que tengan un fenotipo casi activado, tal regulación positiva de CD69 y/o CD44, pero que no muestren función efectora, tal como lo indica la ausencia de síntesis de IFN- γ o IL-17. En algunos casos de la descripción, la administración de las composiciones de la presente descripción da como resultado células T que tienen un fenotipo casi activado sin que tengan transformación de células T vírgenes específicas de antígeno en un fenotipo regulador, tal como los que tienen fenotipos CD25⁺/Foxp3⁺.

En algunos casos de la descripción, la superficie de un transportador (p. ej., partícula) comprende restos químicos y/o grupos funcionales que permiten la conexión (p. ej., de manera covalente, no covalente) de péptidos antigénicos y/u otros elementos funcionales con el transportador. En algunos casos de la descripción, el número, la orientación, la separación, etc. de restos químicos y/o grupos funcionales en el transportador (p. ej., partícula) varían según las características químicas del transportador, la aplicación deseada, etc.

En algunas realizaciones, un transportador comprende uno o más agentes biológicos o químicos adheridos a, adsorbidos en, encapsulado dentro, y/o contenidos en todo el transportador. En algunas realizaciones, un agente químico o biológico está encapsulado y/o contenido en todas las partículas. La presente invención no está limitada por la naturaleza de los agentes químicos o biológicos. Dichos agentes incluyen, pero sin limitación, proteínas, moléculas de ácido nucleico, fármacos de molécula pequeña, lípidos, hidratos de carbono, células, componentes celulares y similares. En algunas realizaciones, sobre el transportador o dentro del mismo se incluyen dos o más (p. ej., 3, 4, 5, etc.) diferentes agentes químicos o biológicos. En algunas realizaciones, los agentes están configurados para velocidades de liberación específicas. En algunas realizaciones, múltiples agentes diferentes están configurados para diferentes velocidades de liberación. Por ejemplo, un primer agente puede liberarse durante un período de horas mientras que un segundo agente se libera durante un período de tiempo más largo (p. ej., días, semanas, meses, etc.). En algunas realizaciones, el transportador o una parte del mismo está configurado para la liberación lenta de agentes biológicos o químicos. En algunas realizaciones, la liberación lenta proporciona la liberación de cantidades biológicamente activas del agente durante un período de al menos 30 días (p. ej., 40 días, 50 días, 60 días, 70 días, 80 días, 90 días, 100 días, 180 días, etc.). En algunas realizaciones, el transportador o una parte del mismo está configurado para ser suficientemente poroso para permitir el crecimiento de células en los poros. El tamaño de los poros puede seleccionarse para tipos de células de interés particular y/o para la cantidad de crecimiento deseado. En algunas realizaciones, las partículas comprenden el antígeno de interés sin otros agentes activos no peptídicos, tales como fármacos o inmunomoduladores. Asimismo, en algunas realizaciones, las partículas de la invención no contienen péptidos inmunostimuladores o inmunosupresores además del antígeno de interés. Asimismo, en algunas realizaciones, las partículas no contienen otras proteínas o péptidos (p. ej., moléculas coestimuladoras, moléculas del MHC, péptidos inmunostimuladores o péptidos inmunosupresores) en la superficie o encapsulados dentro de la partícula.

Sorprendentemente se ha descubierto que la encapsulación del antígeno, agentes biológicos y/o químicos en la partícula de la invención, induce tolerancia inmunológica y tiene diversas ventajas. En primer lugar, las partículas encapsuladas tienen una respuesta de citocinas más lenta. En segundo lugar, cuando se usan múltiples antígenos, agentes biológicos y/o químicos, la encapsulación que podría producirse si los agentes se conectasen a la superficie de la partícula, elimina la competencia entre estas diversas moléculas. En tercer lugar, la encapsulación permite incorporar más antígenos, agentes biológicos y/o químicos con la partícula. En cuarto lugar, la encapsulación permite facilitar el uso de antígenos proteicos complejos o de homogeneizado de órganos (p. ej., homogeneizado de páncreas

para la diabetes de tipo 1 o extracto de cacahuete en la alergia al cacahuete). Finalmente, la encapsulación de antígenos, agentes biológicos y/o químicos dentro de la partícula en lugar de la conjugación con la superficie de la partícula, conserva la carga negativa neta en la superficie de la partícula. La encapsulación del antígeno, agentes biológicos y/o químicos en las partículas de la invención puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica. En un caso de la descripción, los antígenos polipeptídicos se encapsulan en las partículas mediante un proceso de emulsión doble. En una realización adicional, los antígenos polipeptídicos son solubles en agua.

En otro caso de la descripción, los antígenos polipeptídicos se encapsulan en las partículas mediante un proceso de emulsión sencilla. En una realización adicional, los antígenos polipeptídicos son más hidrófobos. Algunas veces, el proceso de emulsión doble conduce a la formación de partículas grandes que pueden dar como resultado la filtración del componente activo hidrófilo y bajas eficacias de atrapamiento. La coalescencia y la maduración de Ostwald son dos mecanismos que pueden desestabilizar la gotita de emulsión doble, y la difusión a través de la fase orgánica del componente activo hidrófilo es el principal mecanismo responsable de los bajos niveles de componente activo atrapado. En algunos casos de la descripción, puede ser beneficioso reducir el tamaño de las nanopartículas. Una estrategia para lograr esto es aplicar una segunda velocidad de cizalla fuerte. El efecto de filtración puede reducirse utilizando una alta concentración de polímero y una alta masa molecular de polímero, acompañado por un aumento en la viscosidad de la fase acuosa interna y en un aumento en la masa molecular del tensioactivo.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona transportadores que sobre ellos (o en su interior) tienen células u otros agentes biológicos o químicos. Cuando se emplean células, los transportadores no están limitados a un tipo particular de células. En algunas realizaciones, los transportadores tienen sobre ellos células de los islotes pancreáticos. En algunas realizaciones, adicionalmente, los transportadores microporosos tienen sobre ellos proteínas de la MEC (matriz extracelular) y/o exendina-4. Los transportadores no están limitados a un tipo particular. En algunas realizaciones, un transportador tiene regiones de porosidad variable (p. ej., tamaño de poro, profundidad de poro y/o densidad de poro variables). En algunas realizaciones, los transportadores tienen, sobre ellos (o en su interior), agentes farmacéuticos, ADN, ARN, proteínas de la matriz extracelular, exendina-4, etc. En ciertos casos, la presente descripción proporciona métodos para trasplantar células de los islotes pancreáticos con dichos transportadores. En ciertas realizaciones de esta invención, el antígeno inductor es una molécula sencilla aislada o producida de manera recombinante. Para tratar afecciones en las que el antígeno objetivo se disemina a varios lugares en el hospedador, generalmente es necesario que el antígeno inductor sea idéntico al antígeno diana o esté inmunológicamente relacionado con el antígeno diana. Ejemplos de dichos antígenos son la mayoría de los antígenos polinucleotídicos y algunos antígenos de hidratos de carbono (tales como antígenos de grupos sanguíneos).

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

Cuando el antígeno diana se expresa preferiblemente en un órgano, célula o tipo de tejido particular, el facultativo tiene nuevamente la opción de usar un antígeno inductor que sea idéntico o esté inmunológicamente relacionado con el antígeno diana. Sin embargo, también existe la opción adicional de utilizar un antígeno que sea un espectador para la diana. Este es un antígeno que puede no estar relacionado inmunológicamente con el antígeno diana, pero que se expresa preferiblemente en un tejido en donde se expresa el antígeno diana. Una teoría de trabajo sobre la eficacia de la supresión espectadora es que la supresión es un proceso activo mediado por células que regula negativamente el grupo efector de la respuesta inmunitaria en las células diana. Las células supresoras se estimulan específicamente por el antígeno inductor en la superficie de la mucosa y se dirigen hacia un sitio tisular donde el antígeno espectador se expresa preferencialmente. A través de un mecanismo interactivo o mediado por citocinas, las células supresoras localizadas regulan después negativamente las células efectoras (o inductoras de las células efectoras) en las proximidades, independientemente en contra de lo que sean reactivas. Si las células efectoras son específicas para una diana diferente del antígeno inductor, entonces el resultado es un efecto espectador. Para una mayor elaboración de la reacción espectadora y una lista de péptidos tolerogénicos que tienen este efecto, se remite al lector a la publicación de patente internacional WO 93/16724. Una implicación de la teoría espectadora es que un experto habitual en la materia no necesita identificar o aislar un antígeno diana particular contra el cual se desea tolerancia para llevar a la práctica la presente invención. El facultativo solo necesita poder obtener al menos una molécula expresada preferiblemente en el sitio diana para su uso como un antígeno inductor.

En ciertas realizaciones de esta invención, el antígeno inductor no tiene la misma forma que la que se expresa en el individuo que se está tratando, pero es un fragmento o derivado del mismo. Los antígenos inductores de esta invención incluyen péptidos basados en una molécula de la especificidad apropiada pero adaptada por fragmentación, sustitución de residuos, marcaje, conjugación y/o fusión con péptidos que tienen otras propiedades funcionales. La adaptación puede realizarse para cualquier propósito deseable, incluyendo, pero sin limitación, la eliminación de cualquier propiedad indeseable, tal como toxicidad o inmunogenicidad; o para mejorar cualquier propiedad deseable, tal como la unión a la mucosa, penetración de la mucosa, o estimulación del grupo tolerogénico de la respuesta inmunitaria. Los términos tales como péptido de insulina, péptido de colágeno y péptido de proteína básica de mielina, como se emplean en esta memoria, no solo se refieren a la subunidad intacta, sino también a variantes alotópicas y sintéticas, a fragmentos, a péptidos de fusión, a conjugados y a otros derivados que contienen una región que es homóloga (preferiblemente 70 % idéntica, más preferiblemente 80 % idéntica e incluso más preferiblemente 90 %

idéntica a nivel de aminoácidos) a al menos 10 y preferiblemente 20 aminoácidos consecutivos de la molécula respectiva para la cual es un análogo, en donde la región homóloga del derivado comparte con la molécula parental respectiva una capacidad para inducir tolerancia al antígeno diana.

5 Se reconoce que, para la estimulación de una respuesta de anticuerpos, las regiones tolerogénicas de un antígeno inductor son a menudo diferentes de los epítomos inmunodominantes. Las regiones tolerogénicas son generalmente regiones que pueden presentarse en células T que intervienen en interacciones celulares particulares. Las regiones tolerogénicas pueden estar presentes y ser capaces de inducir tolerancia después de la presentación del antígeno intacto. Algunos antígenos contienen regiones tolerogénicas crípticas, en donde el procesamiento y la presentación del antígeno nativo normalmente no desencadenan tolerancia. En la publicación de patente internacional WO 10 94/27634, se encuentra una elaboración de antígenos crípticos y su identificación.

15 En ciertas realizaciones de esta invención, se utilizan dos, tres, o una mayor pluralidad de antígenos inductores. Puede ser deseable implementar estas realizaciones de la invención cuando hay una pluralidad de antígenos diana, o proporcionar una pluralidad de espectadores para la diana. Por ejemplo, en el tratamiento de la diabetes se puede mezclar tanto la insulina como el glucagón con un componente de unión a la mucosa. También puede ser deseable proporcionar un cóctel de antígenos para cubrir varias posibles dianas alternativas. Por ejemplo, se podría usar un cóctel de fragmentos de antígeno de histocompatibilidad para tolerizar a un sujeto con antelación a un trasplante futuro con un aloinjerto de fenotipo desconocido. En la técnica se conocen regiones alovariantes de antígenos leucocitarios humanos: p. ej., Immunogenetics 29: 231, 1989. En otro ejemplo, una mezcla de alérgenos puede servir como antígeno inductor para el tratamiento de la atopia.

20 Los antígenos inductores pueden prepararse mediante diversas técnicas conocidas en la materia, dependiendo de la naturaleza de la molécula. Los antígenos de polinucleótidos, polipéptidos e hidratos de carbono pueden aislarse de células de las especies a tratar en donde están enriquecidos. Los péptidos cortos se preparan convenientemente mediante síntesis de aminoácidos. Las proteínas más largas de secuencia conocida pueden prepararse sintetizando una secuencia codificante o amplificando por PCR una secuencia codificante de una fuente o vector natural, y después expresando la secuencia codificante en una célula hospedadora bacteriana o eucariota adecuada.

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

35 En un caso de la descripción, la proteína o péptido antigénico es un autoantígeno, un aloantígeno o un antígeno de trasplante. En otro caso particular de la descripción, el autoantígeno se selecciona del grupo que consiste en proteína básica de mielina, colágeno o fragmentos del mismo, ADN, proteínas nucleares y nucleolares, proteínas mitocondriales y proteínas de células β pancreáticas.

40 La descripción proporciona la inducción de tolerancia a un autoantígeno para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias mediante la administración del antígeno para el que se desea tolerancia. Por ejemplo, en pacientes con esclerosis múltiple, se observan autoanticuerpos dirigidos contra la proteína básica de mielina (PBM), y, por consiguiente, los péptidos o proteínas antigénicos contra la PBM pueden usarse en la descripción que se suministrará usando las composiciones de la presente descripción para tratar y prevenir la esclerosis múltiple.

45 Como otro ejemplo no limitativo, un individuo que es candidato para un trasplante de un semejante no idéntico puede padecer rechazo de las células, tejidos u órganos injertados, ya que los antígenos injertados son extraños para el receptor. La tolerancia previa del individuo receptor al injerto previsto anula o reduce el rechazo posterior. La reducción o eliminación de terapias crónicas contra el rechazo se puede realizar llevando a la práctica la presente descripción. En otro ejemplo, muchas enfermedades autoinmunitarias se caracterizan por una respuesta inmunitaria celular contra un antígeno endógeno o autoantígeno. La tolerancia del sistema inmunitario contra el antígeno endógeno es deseable para controlar la enfermedad.

50 En un ejemplo adicional, la sensibilización de un individuo contra un contaminante industrial o químico, como los que se pueden encontrar en el trabajo, conlleva el riesgo de que se produzca una respuesta inmunitaria. La tolerancia previa del sistema inmunitario del individuo contra la sustancia química, en particular en forma del producto químico que ha reaccionado con las proteínas endógenas del individuo, puede ser deseable para prevenir el desarrollo ocupacional posterior de una respuesta inmunitaria.

55 Los alérgenos son otros antígenos para los que también es deseable la tolerancia de la respuesta inmunitaria contra los mismos. En la invención, el antígeno es una gliadina. En una realización adicional, el antígeno es gliadina A.

En especial, incluso en enfermedades en donde se desconoce el autoantígeno patógeno, la supresión espectadora puede inducirse usando antígenos presentes en las inmediaciones anatómicas. Por ejemplo, en la artritis reumatoide

se observan autoanticuerpos contra el colágeno y, por consiguiente, como módulo génico que expresa el antígeno se puede utilizar un gen codificante de colágeno para tratar la artritis reumatoide (véase, p. ej., Choy (2000) *Curr Opin Investig Drugs* 1: 58-62). Asimismo, para prevenir el desarrollo de la diabetes de tipo 1, puede utilizarse la tolerancia contra autoantígenos de células beta (véase, p. ej., Bach y Chatenoud (2001) *Ann Rev Immunol* 19: 131-161).

- 5 Como otro ejemplo, se observan autoanticuerpos dirigidos contra la glucoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG, siglas del inglés *myelin oligodendrocyte glycoprotein*) en la encefalomiелitis autoinmunitaria y en muchas otras enfermedades del SNC, así como en la esclerosis múltiple (véase, p. ej., Iglesias et al. (2001) *Glia* 36: 22-34). Por consiguiente, el uso de construcciones que expresan el antígeno MOG en la descripción, permite el tratamiento de la esclerosis múltiple así como de trastornos autoinmunitarios relacionados del sistema nervioso central.
- 10 Otros ejemplos más de autoantígenos candidatos para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias incluyen: antígenos de células beta pancreáticas, insulina y GAD para tratar la diabetes mellitus insulino-dependiente; colágeno de tipo 11, gp 39 de cartílago humano (HCgp39) y gp130-RAPS para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide; proteína básica de mielina (PBM), proteína proteolipídica (PLP) y glucoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG, véase anteriormente) para tratar la esclerosis múltiple; fibrilarina y proteína nucleolar pequeña (snoRNP) para tratar la esclerodermia; receptor del factor estimulador tiroideo (TSH-R) para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Graves; antígenos nucleares, histonas, glucoproteína gp70 y proteínas ribosómicas para su uso en el tratamiento del lupus eritematoso sistémico; piruvato deshidrogenasa dihidroliipoamida acetiltransferasa (PCD-E2) para su uso en el tratamiento de la cirrosis biliar primaria; antígenos del folículo piloso para su uso en el tratamiento de la alopecia areata; y la isoforma 5 de tropomiosina humana (hTM5) para su uso en el tratamiento de la colitis ulcerosa.

En un caso de la descripción, las partículas de la invención están acopladas a antígenos que comprenden uno o más epítomos asociados a alergias, enfermedades autoinmunitarias y/o enfermedades o trastornos inflamatorios. Los antígenos pueden comprender una o más copias de un epítomo. En una realización, los antígenos comprenden un solo epítomo asociado a una enfermedad o trastorno. En una realización adicional, los antígenos comprenden más de un epítomo asociado a la misma enfermedad o trastorno. En otra realización más, los antígenos comprenden más de un epítomo asociado a diferentes enfermedades o trastornos. En una realización adicional, los antígenos comprenden uno o más epítomos asociados a una o más alergias. En un caso adicional de la descripción, los antígenos comprenden uno o más epítomos asociados a esclerosis múltiple, diabetes de tipo 1, celiaquía y/o enfermedad inflamatoria intestinal, incluyendo enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. En un caso de la descripción, los epítomos son de proteína básica de mielina (p. ej., SEQ ID NO: 4975 y 4976), proteína proteolipídica (p. ej., SEQ ID NO: 4977), glucoproteína de la mielina de oligodendrocitos (p. ej., SEQ ID NO: 1 y 4978), acuaporina, (p. ej., SEQ ID NO: 4979), glucoproteína asociada a mielina (p. ej., SEQ ID NO: 4980), insulina (p. ej., SEQ ID NO: 4981), ácido glutámico descarboxilasa (p. ej., SEQ ID NO: 4982), gliadina (p. ej., SEQ ID NO: 4983-4985 o 5136-5140), la cadena $\alpha 3$ de colágeno de tipo IV (p. ej., SEQ ID NO: 5017), o fragmentos, homólogos o isoformas de los mismos. En un caso adicional de la descripción, los epítomos son de gluten, incluyendo de gliadina y/o glutenina. En un caso de la descripción, los epítomos son de homólogos de insulina, tales como los descritos en la patente de los Estados Unidos N.º 8 476 228. En una realización, los epítomos de gliadina son las SEQ ID NO: 13, 14, 16, 320 o 321 de la solicitud de los Estados Unidos N.º 20110293644.

En las Tablas 2 y 3 se describen ejemplos adicionales no limitativos de epítomos asociados a diversas enfermedades autoinmunitarias y/o enfermedades o trastornos inflamatorios que se contemplan en la presente descripción.

Tabla 2 - Epítomos lineales representativos

Enfermedad	Epítomos representativos
Esclerosis múltiple	SEQ ID NO: 2-1294
Celiaquía	SEQ ID NO: 1295-1724; SEQ ID NO: 1726-1766; SEQ ID NO: 4986-5140
Diabetes	SEQ ID NO: 1767-1840; SEQ ID NO: 1842-1962; SEQ ID NO: 1964-2027; SEQ ID NO: 2029-2073; SEQ ID NO: 2075-2113; SEQ ID NO: 2115-2197; SEQ ID NO: 2199-2248; SEQ ID NO: 2250-2259; SEQ ID NO: 2261-2420; SEQ ID NO: 2422-2486; SEQ ID NO: 2489-2505
Artritis reumatoide	SEQ ID NO: 2506-3260; SEQ ID NO: 3262-3693
Lupus eritematoso sistémico	SEQ ID NO: 3694-3857; SEQ ID NO: 3860-4565

Síndrome de Good Pasture	SEQ ID NO: 4566-4576; SEQ ID NO: 4578-4610; SEQ ID NO: 4612-4613; SEQ ID NO: 5018-5039
Uveítis autoinmunitaria	SEQ ID NO: 4614-4653
Tiroiditis autoinmunitaria	SEQ ID NO: 4654-4694; SEQ ID NO: 4696-4894; SEQ ID NO: 4896-4901
Miositis autoinmunitaria	SEQ ID NO: 4902-4906
Vasculitis autoinmunitaria	SEQ ID NO: 4907-4914
Pancreatitis autoinmunitaria	SEQ ID NO: 4915-4917
Enfermedad de Crohn	SEQ ID NO: 4918-4941
Colitis ulcerosa	SEQ ID NO: 4942-4952
Psoriasis	SEQ ID NO: 4953-4963
Artritis reactiva	SEQ ID NO: 4964-4974

No todos los epítomos son epítomos lineales; los epítomos también pueden ser epítomos discontinuos, conformacionales. Se conocen diversos epítomos discontinuos asociados a enfermedades autoinmunitarias o a enfermedades y/o trastornos inflamatorios. En la tabla 3 se describen ejemplos no limitantes de epítomos discontinuos.

Tabla 3- Epítomos discontinuos representativos

Enfermedad	Epítomo	Polipéptido de longitud completa
Celiaquía	D151, E153, E154, E155, E158; D306, N308, N310; D434, E435, E437, D438; E329; E153; R19, E153, M659; o C277, H335, D358	Proteína-glutamina gamma-glutamilttransferasa 2 SEQ ID NO: 1725
Diabetes	E517; R255, F256, K257, K263, E264, K265, L270, P271, R272, L273, L285, K286, K287, I294, G295, T296, D297, S298, R317, R318; N483, I484, I485, K486, N487, R488, E489, G490, Y491, E492, M493, V494, F495, D496, G497, K498, P499, F556, F557, R558, M559, V560, I561, S562, N563, P564, A565, A566, T567, H568, Q569, D570, I571, D572, F573, L574, I575, E576, E577, I578, E579, R580, L581, G582, Q583, D584, L585; E264; E517, E520, E521, S524, S527, V532; E517, E521; K358; R536, Y540	Glutamato descarboxilasa 2 SEQ ID NO: 1841, 1963, 2114, y 2249
Diabetes	P876, A877, E878, T880; T804; T804, V813, D821, R822, Q862, P886; T804, V813, D821, R822, Q862, P886; W799, E836, N858; D911; Q862; L831, H833, V834, E836, Q860; W799, E836, N858;	proteína tirosina fosfatasa, tipo de receptor, precursor N SEQ ID NO: 2028 y 2074

ES 2 762 187 T3

	W799, L831, H833, V834, Y835, E836, Q860;	
Diabetes	R325, R332, E333, K336, K340; R325; W325	isoforma 8 transportadora de cinc SEQ ID NO: 2421
Diabetes	E872, C945	Proteína tirosina fosfatasa N2 de tipo receptor SEQ ID NO: 2198, 2260, y 2487
Diabetes	W799, C909	tirosina fosfatasa SEQ ID NO: 2488
Artritis reumatoide	L14, M15, I16, S17, R18, N147, G148, S187, M191, H196, N197, H198, Y199, Q201, S203	Cadena A, Estructura cristalina de un Fab del Factor Reumatoide de Igm Humano en complejo con su Fc de Igg Autoantigénico SEQ ID NO: 3261
Lupus eritematoso sistémico	K591, S592, G593	Subunidad 1 de la ADN helicasa 2 dependiente de ATP SEQ ID NO: 3858
Lupus eritematoso sistémico	MI, K2, L3, V4, R5, F6, L7, M8, K9, L10, S11, H12, E13, T14, V15, T16, I17, E18, L19, K20, N21, G22, T23, Q24, V25, H26, P85, K86, V87, K88, S89, K90, K91, R92, E93, A94, V95, A96, G97, R98, G99, R100, G101, R102, G103, R104, G105, R106, G107, R108, G109, R110, G111, R112, G113, R114, G115, G116, P117, R118, R119	Ribonucleoproteína nuclear pequeña Sm D1 SEQ ID NO: 3859
Lupus eritematoso sistémico	G59, R62	beta-2-gluco proteina I SEC ID NO: 4357
Síndrome de Good Pasture	T24, A25, I26, S28, E31, V34, P35, S38, Q64	cadena alfa3 de colágeno de tipo IV SEQ ID NO: 4577
Síndrome de Good Pasture	T1455, A1456, I1457, S1459, E1462, T1464, V1465, P1466, Y1468, S1469, Q1495, T1537, T1565, P1569, H1572, K1579, A1634	alfa3 de colágeno tipo IV SEC ID NO: 4611
Tiroiditis autoinmunitaria	E604, D620, K627, D630; R225, R646, D707; K627; R225; Y772; K713, F714, P715, E716; P715, D717	Peroxidasa tiroidea SEQ ID NO: 4695
Tiroiditis autoinmunitaria	D36, R38, K42, Q55, K58, I60, E61, R80, Y82, S84, T104, H105, E107, R109, N110, K129, F130, D151, F153, I155, E157, T181, K183, D203	Receptor de tirotrina SEQ ID NO: 4895

Las combinaciones de antígenos y/o epítomos pueden analizarse con respecto a su capacidad de promover la tolerancia realizando experimentos con células aisladas o en modelos animales.

En algunas realizaciones, las composiciones inductoras de tolerancia de la presente invención contienen una molécula de señalización de apoptosis (p. ej., además de un péptido antigénico u otra molécula antigénica). En algunas realizaciones, la molécula de señalización de apoptosis está acoplada con y/o asociada a la superficie del transportador. En algunas realizaciones, una molécula de señalización de apoptosis permite que las células

presentadoras de antígeno del hospedador, tales como las células del sistema reticuloendotelial del hospedador, perciban un transportador como un cuerpo apoptótico; esto permite la presentación de los epítomos peptídicos asociados de una manera inductora de tolerancia. Sin quedar ligados a ninguna teoría, se supone que esto impide la regulación positiva de las moléculas implicadas en la estimulación de células inmunitarias, tales como moléculas del MHC de clase I/II y coestimuladoras. Estas moléculas de señalización de apoptosis también pueden servir como marcadores fagocíticos. Por ejemplo, en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 20050113297 se han descrito moléculas de señalización de apoptosis adecuadas para la presente invención. Las moléculas adecuadas para la presente invención incluyen moléculas que se dirigen a fagocitos, que incluyen macrófagos, células dendríticas, monocitos, granulocitos y neutrófilos.

En algunas realizaciones, las moléculas adecuadas como moléculas de señalización apoptótica actúan para mejorar la tolerancia de los péptidos asociados. Adicionalmente, un transportador unido a una molécula de señalización de apoptosis puede unirse a Clq en el reconocimiento de células apoptóticas (Paidassi et al., (2008) J. Immunol. 180:2329-2338. Por ejemplo, moléculas que pueden ser útiles como moléculas de señalización apoptótica incluyen fosfatidil serina, anexina-1, anexina-5, factor 8 del EGF (factor de crecimiento endotelial) de glóbulos grasos lácteos (MFG-E8) o familia de las trombospondinas (p. ej., trombospondina-1 (TSP- 1)). Con la presente invención se comentan varias moléculas adecuadas para su uso como moléculas de señalización apoptótica, por ejemplo, en la solicitud de patente de Estados Unidos 2012/0076831.

En algunas realizaciones, la molécula de señalización apoptótica puede conjugarse con el péptido específico de antígeno. En algunos casos, la molécula de señalización apoptótica y el péptido específico de antígeno se conjugan mediante la creación de una proteína de fusión. p. ej., una proteína de fusión puede comprender al menos un péptido específico de antígeno (o un fragmento o una variante del mismo) acoplado a al menos una molécula de una molécula de señalización apoptótica (o un fragmento o una variante de la misma). Para la creación de proteínas de fusión, los términos "proteína de fusión" "péptido de fusión" "polipéptido de fusión" y "péptido quimérico" se usan de manera intercambiable. Los fragmentos adecuados del péptido específico de antígeno incluyen cualquier fragmento del péptido de longitud completa que conserve la función de generar la función de tolerancia específica de antígeno deseada de la presente invención. La proteína de fusión se puede crear mediante diversos medios conocidos en la técnica (p. ej., fusión genética, conjugación química, etc.). Las dos proteínas pueden fusionarse directamente o mediante un enlazador aminoacídico. Normalmente, los polipéptidos que forman la proteína de fusión están ligados del extremo N-terminal al extremo C-terminal, aunque también se pueden ligar del extremo C-terminal al extremo C-terminal, del extremo N-terminal al extremo N-terminal o del extremo C-terminal al extremo N-terminal. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden. Se puede emplear una secuencia enlazadora de péptidos para separar el primer y el segundo componente del polipéptido a una distancia suficiente para garantizar que cada polipéptido se pliegue en sus estructuras secundaria y terciaria. Las secuencias de aminoácidos que pueden emplearse útilmente como enlazadores incluyen las descritas en Maratea et. al., Gene 40:39-46 (1985); Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262 (1986); y en las patentes de Estados Unidos N.º 4 935 233 y 4 751 180. Generalmente, la secuencia enlazadora puede tener una longitud que varíe de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos. En algunas realizaciones, las secuencias enlazadoras no son necesarias y/o no se utilizan, por ejemplo, cuando el primer y el segundo polipéptidos tienen regiones de aminoácidos en el extremo N-terminal no esenciales que pueden usarse para separar los dominios funcionales e impedir la interferencia estérica.

Una medida de la actividad tolerogénica es la capacidad que tiene un antígeno o fragmento intacto para estimular la producción de una citocina apropiada en el sitio diana. Se piensa que la citocina inmunorreguladora liberada por las células T supresoras en el sitio diana es el TGF- β (siglas del inglés *transforming growth factor beta*, factor de crecimiento transformante beta) (Miller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 421, 1992). Otros factores que pueden producirse durante la tolerancia son las citocinas IL4 e IL-10, y el PGE mediador. Por el contrario, los linfocitos en los tejidos que sufren destrucción inmunitaria activa secretan citocinas tales como IL-1, IL-2, IL-6 y γ -IFN. Por lo tanto, la eficacia de un antígeno inductor candidato puede evaluarse midiendo su capacidad para estimular el tipo apropiado de citocinas.

Teniendo esto en cuenta, utilizando animales singénicos como donantes para ensayos celulares *in vitro*, puede realizarse una prueba de exploración rápida para determinar epítomos tolerogénicos del antígeno inductor, componentes eficaces de unión a la mucosa, combinaciones eficaces, o modos y programas de administración eficaces en la mucosa. Los animales se tratan en una superficie de la mucosa con la composición de prueba, y en algún momento se exponen a la administración parenteral del antígeno diana en adyuvante completo de Freund. Los esplenocitos se aíslan y se cultivan *in vitro* en presencia del antígeno diana a una concentración de aproximadamente 50 μ g/ml. El antígeno diana puede sustituirse por proteínas candidatas o subfragmentos para cartografiar la ubicación de epítomos tolerogénicos. La secreción de citocinas en el medio puede cuantificarse mediante inmunoensayos convencionales.

La capacidad de las células para suprimir la actividad de otras células se puede determinar usando células aisladas de un animal inmunizado con el antígeno diana, o creando una línea celular que responda al antígeno diana (Ben-Nun et al., Eur. J. Immunol. 11: 195, 1981. En una variación de este experimento, la población de células supresoras se irradia levemente (de aproximadamente 1 000 a 1 250 rads) para impedir la proliferación, las células supresoras se cultivan conjuntamente con las células respondedoras, y después se utiliza la incorporación de timidina tritiada (o MTT) para cuantificar la actividad proliferativa de las células respondedoras. En otra variante, la población de células

supresoras y la población de células respondedoras se cultivan en los niveles superior e inferior de un sistema de cultivo *transwell* de doble cámara (Costar, Cambridge, Mass.), lo que permite a las poblaciones incubarse conjuntamente a una distancia entre sí de 1 mm, separadas por una membrana de policarbonato (WO 93/16724). En este planteamiento, la irradiación de la población de células supresoras es innecesaria, ya que la actividad proliferativa de las respondedoras se puede medir por separado.

En realizaciones de la invención en donde el antígeno diana ya está presente en el individuo, no es necesario aislar el antígeno o precombinarlo con el componente de unión a la mucosa. Por ejemplo, el antígeno puede expresarse en el individuo de una determinada manera como resultado de una afección patológica (tal como enfermedad inflamatoria intestinal o celiacía) o ingiriendo un alérgeno alimentario. El análisis se realiza administrando el componente de unión a la mucosa en una o más dosis o formulaciones, y determinando su capacidad para promover la tolerización contra el antígeno *in situ*.

La eficacia de las composiciones y los modos de administración para el tratamiento de enfermedades específicas también se pueden elaborar en un modelo de enfermedad animal correspondiente. La capacidad del tratamiento para disminuir o retrasar la sintomatología de la enfermedad se monitoriza a nivel de rasgos distintivos bioquímicos e inmunológicos en circulación de la enfermedad, inmunohistología del tejido afectado y características clínicas generales según sea apropiado para el modelo empleado. En la siguiente sección se incluyen ejemplos no limitativos de modelos animales que pueden usarse en los análisis.

La invención contempla la modulación de la tolerancia modulando la respuesta de TH1, la respuesta de TH2, la respuesta de TH17, o una combinación de estas respuestas. La modulación de la respuesta de TH1 incluye el cambio de expresión de, p. ej., interferón gamma. La modulación de la respuesta de TH2 incluye el cambio de expresión de, p. ej., cualquier combinación de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Normalmente, un aumento (disminución) en la respuesta de TH2 comprenderá un aumento (disminución) en la expresión de al menos una de IL-4, IL-5, IL-10 o IL-13; más normalmente, un aumento (disminución) en la respuesta de TH2 comprenderá un aumento en la expresión de al menos dos de IL-4, IL-5, IL-10 o IL-13, lo más normalmente, un aumento (disminución) en la respuesta de TH2 comprenderá un aumento en al menos tres de DL-4, IL-5, IL-10 o IL-13, mientras que idealmente un aumento (disminución) en la respuesta de TH2 comprenderá un aumento (disminución) en la expresión de todas las IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. La modulación de TH 17 incluye el cambio de expresión de, p. ej., TGF- beta, IL-6, IL-21 e IL23, y afecta a los niveles de IL-17, IL-21 e IL-22.

En la técnica se conocen otros métodos adecuados para evaluar la eficacia de las composiciones y métodos de la presente invención, como se comenta, por ejemplo, en la solicitud de patente de Estados Unidos 2012/0076831.

Ciertas realizaciones de esta invención se refieren a la sensibilización de inmunotolerancia en un individuo sin inducción de tolerancia previa por intervención terapéutica. Estas realizaciones generalmente implican una pluralidad de administraciones de una combinación de antígeno y componente de unión a la mucosa. Normalmente, para obtener un resultado duradero, durante la sensibilización se realizan al menos tres administraciones, con frecuencia al menos cuatro administraciones, y algunas veces, al menos seis administraciones, aunque el sujeto puede mostrar manifestaciones de tolerancia temprana durante el tratamiento. Con mucha frecuencia, cada dosis se ofrece como una administración en embolada, aunque también son adecuadas las formulaciones sostenidas que pueden liberarse en la mucosa. Cuando se realizan múltiples administraciones, el tiempo entre las administraciones generalmente varía entre 1 día y 3 semanas, y normalmente entre aproximadamente 3 días y 2 semanas. Generalmente, el mismo antígeno y el componente de unión a la mucosa están presentes a la misma concentración, y la administración se ofrece a la misma superficie de la mucosa, aunque durante un ciclo de tratamiento pueden adaptarse variaciones de cualquiera de estas variables.

Otras realizaciones de esta invención se refieren a reforzar o prolongar la persistencia de una inmunotolerancia previamente establecida. Estas realizaciones generalmente implican una administración o un ciclo de tratamiento corto en un momento en que la tolerancia establecida está disminuyendo o en riesgo de disminuir. Generalmente el refuerzo se realiza de 1 mes a 1 año, y normalmente de 2 a 6 meses después de la sensibilización o un refuerzo previo. Esta invención también incluye realizaciones que implican el mantenimiento regular de la tolerancia en un programa de administraciones que se producen dos veces por semana, todas las semanas, cada dos semanas o en cualquier otro programa regular.

Las partículas de la presente invención pueden ofrecerse en cualquier dosis eficaz para amortiguar la respuesta inmunitaria inflamatoria en un sujeto que lo necesite o para tratar una infección bacteriana o vírica en un sujeto que lo necesite. En ciertas realizaciones, al individuo se le proporciona de aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^{20} partículas. En una realización adicional, se proporciona entre aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^{15} partículas. En otra realización adicional, se proporciona entre aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} partículas. Incluso en otra realización adicional, se proporciona entre aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{10} partículas. En una realización preferida, la dosis preferida es 0,1 % sólidos/ml. Por lo tanto, para perlas de 0,5 μm , una dosis preferida es de aproximadamente 4×10^9 perlas, para perlas de 0,05 μm , una dosis preferida es de aproximadamente 4×10^{12} perlas, para perlas de 3 μm , una dosis preferida es de 2×10^7 perlas. Sin embargo, cualquier dosis que sea eficaz en el tratamiento de la afección particular a tratar está incluida en la presente invención.

La descripción es útil para el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunitario, tales como enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplante, deficiencias enzimáticas y reacciones alérgicas. La sustitución de un sistema de partículas sintéticas y biocompatibles para inducir inmunotolerancia podría conducir a facilitar la fabricación, ampliar la disponibilidad de agentes terapéuticos, aumentar la uniformidad entre muestras, aumentar el número de posibles sitios de tratamiento y reducir drásticamente la posibilidad de que se produzcan respuestas alérgicas contra una célula transportadora.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "respuesta inmunitaria" incluye respuestas inmunitarias mediadas por células T y/o células B. Las respuestas inmunitarias ejemplares incluyen respuestas de células T, p. ej., producción de citocinas y citotoxicidad celular. Además, la expresión respuesta inmunitaria incluye respuestas inmunitarias que se ven indirectamente afectadas por la activación de células T, p. ej., producción de anticuerpos (respuestas humorales) y activación de células sensibles a citocinas, p. ej., macrófagos. Las células inmunitarias implicadas en la respuesta inmunitaria incluyen linfocitos, tales como células B y células T (CD4⁺, CD8⁺, células Th1 y Th2); células presentadoras de antígeno (p. ej., células presentadoras de antígeno profesionales tales como células dendríticas, macrófagos, linfocitos B, células de Langerhans y células presentadoras de antígenos no profesionales tales como queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos, oligodendrocitos); células citolíticas naturales; células mieloides, tales como macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos. En algunas realizaciones, las partículas modificadas de la presente invención son eficaces para reducir el tránsito de células inflamatorias al sitio de inflamación.

Como se emplea en esta memoria, los términos "anergia", "tolerancia" o "tolerancia específica de antígeno", se refieren a la insensibilidad de las células T frente a la estimulación mediada por receptores de células T. Dicha insensibilidad es generalmente específica de antígeno y persiste después de haber cesado la exposición al péptido antigénico. Por ejemplo, la anergia en las células T se caracteriza por la falta de producción de citocinas, p. ej., IL-2. La anergia en células T ocurre cuando las células T se exponen al antígeno y reciben una primera señal (un receptor de células T o una señal mediada por CD-3) en ausencia de una segunda señal (una señal coestimuladora). En estas condiciones, la reexposición de las células al mismo antígeno (incluso si la reexposición se produce en presencia de una molécula coestimuladora) da como resultado fallos en la producción de citocinas y, por consiguiente, fallos en la proliferación. Por tanto, un fallo en la producción de citocinas impide la proliferación. Sin embargo, las células T anérgicas pueden proliferar si se cultivan con citocinas (p. ej., IL-2). Por ejemplo, la anergia de células T también puede observarse por la falta de producción de IL-2 por parte de los linfocitos T, medida por ELISA o por un ensayo de proliferación usando una línea celular indicadora. Como alternativa, se puede usar una construcción de gen indicador. Por ejemplo, las células T anérgicas no pueden iniciar la transcripción del gen de DL-2 inducida por un promotor heterólogo bajo el control del potenciador del gen de IL-2 en 5' o por un múltiplo de la secuencia API que puede encontrarse en el potenciador (Kang et al. 1992 Science. 257:1134).

Como se emplea en esta memoria, la expresión "tolerancia inmunológica" se refiere a métodos realizados en una proporción de sujetos tratados en comparación con sujetos no tratados en donde: a) un nivel disminuido de una respuesta inmunológica específica (que se cree que está mediada, al menos en parte, por linfocitos T efectores específicos de antígeno, linfocitos B, anticuerpos, o sus equivalentes); b) un retraso en la aparición o progresión de una respuesta inmunológica específica; o c) un riesgo reducido de la aparición o progresión de una respuesta inmunológica específica. La tolerancia inmunológica "específica" se produce cuando se suscita tolerancia inmunológica preferencialmente contra ciertos antígenos en comparación con otros. La tolerancia inmunológica "no específica" se produce cuando se suscita tolerancia inmunológica indiscriminadamente contra antígenos que conducen a una respuesta inmunitaria inflamatoria. La tolerancia inmunológica "casi-específica" se produce cuando se suscita tolerancia inmunológica de forma semidiscriminada contra antígenos que conducen a una respuesta inmunitaria patógena, pero no contra otros que conducen a una respuesta inmunitaria protectora.

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

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para aumentar la presentación del antígeno al mismo tiempo que se suprime o reduce la estimulación celular dependiente de TLR7/8, TLR9, y/o TLR 7/8/9. Como se describe en la presente memoria, la administración de partículas modificadas particulares da como resultado la presentación de antígenos por las CD o CPA al mismo tiempo que se suprimen las respuestas celulares dependientes de TLR 7/8, TLR9 y/o TLR7/8/9 asociadas a polinucleótidos inmunoestimuladores. Dicha supresión puede incluir niveles disminuidos de una o más citocinas asociadas a TLR.

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

Por consiguiente, en otro aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas, que comprenden las partículas inmunomodificadoras y que opcionalmente comprenden un transportador farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, estas composiciones comprenden opcionalmente además uno o más agentes terapéuticos adicionales. Como alternativa, las partículas modificadas de la presente invención pueden administrarse a un paciente que lo necesite en combinación con la administración de uno o más agentes terapéuticos distintos. Por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales para la administración conjunta o inclusión en una composición farmacéutica con un compuesto de esta invención, puede ser un agente antiinflamatorio autorizado, o puede ser uno cualquiera de diversos agentes sometidos a autorización en la Administración de alimentos y fármacos que finalmente obtienen la autorización para el tratamiento de cualquier trastorno caracterizado por una respuesta inmunitaria inflamatoria no controlada o una infección bacteriana o vírica. También se apreciará que determinadas partículas modificadas de la presente invención pueden existir en forma libre para el tratamiento, o cuando sea apropiado, como un derivado de las mismas farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden adicionalmente un transportador farmacéuticamente aceptable, que, como se emplea en esta memoria, incluye todos y cada uno de los solventes, diluyentes u otro vehículo líquido, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea adecuado para la forma de dosificación particular deseada. En Remington's Pharmaceutical Sciences, decimosexta edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) se describen diversos transportadores utilizados en la formulación de las composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para su preparación. Excepto en la medida en que cualquier medio transportador convencional sea incompatible con los compuestos de la invención, tal como produciendo cualquier efecto biológico indeseable o, de otra manera, interaccionando de modo perjudicial con cualquier otro componente o componentes de la composición farmacéutica, su uso se contempla dentro del alcance de esta invención. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites tales como aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo, aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles; tales como propilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido alginico; agua apirógena; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico y soluciones de tampón fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, agentes aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en la composición, según el criterio del formulador.

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

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

Para la modulación de una respuesta inmunitaria, las cantidades eficaces y el método de administración de la presente descripción pueden variar en función del individuo, de la afección que se vaya a tratar y de otros factores que son obvios para un experto en la técnica. Los factores a tener en cuenta incluyen la vía de administración y la cantidad de dosis a administrar. Dichos factores son conocidos en la técnica y está dentro de la habilidad de los expertos en la técnica realizar dichas determinaciones sin excesiva experimentación. Un intervalo de dosificación adecuado es uno que proporcione una regulación inmunitaria deseada. Intervalos de dosificación útiles del transportador, proporcionados en cantidades de transportador suministrado, pueden ser, p. ej., de aproximadamente cualquiera de los siguientes: de 0,5 a 10 mg/kg, de 1 a 9 mg/kg, de 2 a 8 mg/kg, de 3 a 7 mg/kg, de 4 a 6 mg/kg, 5 mg/kg, de 1 a 10 mg/kg, de 5 a 10 mg/kg. Como alternativa, la dosificación se puede administrar en función del número de partículas. Por ejemplo, dosificaciones útiles del transportador, proporcionadas en cantidades de transportador suministrado, pueden ser, por ejemplo, de aproximadamente 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , o de mayor número de partículas por dosis. La cantidad absoluta proporcionada a cada paciente depende de propiedades farmacológicas tales como biodisponibilidad, tasa de eliminación y vía de administración. Los detalles de transportadores, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables y los métodos de preparación de composiciones y formulaciones farmacéuticas, se

proporcionan en Remingtons Pharmaceutical Sciences decimotercera edición, 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa., USA.

La cantidad eficaz y el método de administración de la formulación del transportador particular pueden variar dependiendo del paciente individual, del resultado deseado y/o del tipo de trastorno, del estadio de la enfermedad y de otros factores que son obvios para un experto en la técnica. La(s) vía(s) de administración útil(es) en una aplicación particular es(son) obvia(s) para un experto en la técnica. Las vías de administración incluyen, pero sin limitación a tópicos, la vía dérmica, transdérmica, transmucosa, epidérmica, parenteral, gastrointestinal, nasofaríngea y pulmonar, incluyendo transbronquial y transalveolar. Un intervalo de dosificación adecuado es uno que proporciona una composición suficiente que contiene IRP para alcanzar una concentración tisular de aproximadamente 1-50 μM medida en niveles en sangre. La cantidad absoluta proporcionada a cada paciente depende de propiedades farmacológicas tales como biodisponibilidad, tasa de eliminación y vía de administración.

La presente invención proporciona formulaciones transportadoras adecuadas para aplicación tópica que incluyen, pero sin limitación, implantes, pomadas, cremas, enjuagues y geles fisiológicamente aceptables. Las rutas ejemplares de administración dérmica son aquellas que son menos invasivas, tales como la transmisión transdérmica, la administración epidérmica y la inyección subcutánea.

La administración transdérmica se realiza mediante la aplicación de una crema, un enjuague, un gel, etc., capaz de permitir que el transportador penetre en la piel y entre en la corriente sanguínea. Las composiciones adecuadas para administración transdérmica incluyen, pero sin limitación, suspensiones, aceites, cremas y pomadas farmacéuticamente aceptables, aplicados directamente sobre la piel o incorporados en un transportador protector tal como un dispositivo transdérmico (denominado "parche"). Ejemplos de cremas, pomadas etc. adecuados, pueden encontrarse, p. ej., en the Physician's Desk Reference. La transmisión transdérmica también se puede realizar mediante iontoforesis, p. ej., utilizando parches disponibles en el comercio que suministran su producto continuadamente a través de la piel intacta durante períodos de varios días o más. El uso de este método permite la transmisión controlada de composiciones farmacéuticas en concentraciones relativamente grandes, permite la infusión de fármacos combinados y permite el uso contemporáneo de un promotor de absorción.

Las vías de administración parenteral incluyen, pero sin limitación, inyección eléctrica (iontoforesis) o inyección directa, tal como inyección directa en un catéter venoso central, inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, inyección intradérmica o subcutánea. Las formulaciones de transportadores que son adecuadas para la administración parenteral se formulan generalmente en agua USP o en agua para inyección y además pueden comprender tampones de pH, agentes salinos formadores de volumen, conservantes y otros excipientes farmacéuticamente aceptables. El polinucleótido inmunorregulador para inyección parenteral puede formularse en soluciones isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables tales como solución salina y solución salina tamponada con fosfato para inyección.

Las vías de administración gastrointestinal incluyen, pero sin limitación, la vía por ingestión y rectal y puede incluir el uso de, por ejemplo, polvos, píldoras o líquidos farmacéuticamente aceptables para ingestión y supositorios para administración rectal.

La administración nasofaríngea y pulmonar se realizan por inhalación e incluyen vías de suministro tales como la vía intranasal, transbronquial y transalveolar. La invención incluye formulaciones de transportadores adecuados para administración por inhalación que incluyen, pero sin limitación, suspensiones líquidas para formar aerosoles, así como formas en polvo para sistemas de suministro por inhalación de polvo seco. Los dispositivos adecuados para la administración por inhalación de las formulaciones de transportadores incluyen, pero sin limitación, atomizadores, vaporizadores, nebulizadores y dispositivos de suministro por inhalación de polvo seco.

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

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

Para prolongar el efecto de un fármaco, a menudo es deseable retrasar la absorción del fármaco por inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr usando una suspensión líquida o un material cristalino o amorfo con poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Como alternativa, la absorción retardada de una forma farmacológica administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleaginoso. Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas del fármaco en

polímeros biodegradables tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la proporción de fármaco con respecto a polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, la tasa de liberación del fármaco se puede controlar. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

En algunas realizaciones, las partículas sintéticas y biodegradables de la presente invención proporcionan facilidad de fabricación, ampliar la disponibilidad de agentes terapéuticos y aumentar los sitios de tratamiento. En realizaciones particulares, las partículas de poli(láctido-co-glicólido) biodegradables funcionalizadas en la superficie con una alta densidad de grupos carboxilato en la superficie, sintetizadas utilizando el tensioactivo poli(anhídrido maleico-*alt*-etileno) proporcionan un transportador que ofrece numerosas ventajas sobre otras partículas transportadoras y/o superficies. Los experimentos llevados a cabo durante el desarrollo de las realizaciones de la presente invención, demostraron la conjugación de péptidos (p. ej., péptido de PLP₁₃₉₋₁₅₁) con estas partículas. Dichas partículas acopladas a péptidos han demostrado ser eficaces para la prevención del desarrollo de la enfermedad y la inducción de tolerancia inmunológica (p. ej., en el modelo murino de esclerosis múltiple de EAE-R inducida por PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA en ratones SJL/J). Los transportadores acoplados a péptidos de la presente invención proporcionan numerosas ventajas sobre otras estructuras de inducción de tolerancia. En algunas realizaciones, las partículas son biodegradables y, por lo tanto, no persistirán durante mucho tiempo en el organismo. El tiempo para que se produzca la degradación completa se puede controlar. En algunas realizaciones, las partículas se funcionalizan para facilitar la internalización sin activación celular (p. ej., fosfatidilserina cargada en microesferas de PLG). En algunas realizaciones, las partículas incorporan ligandos de direccionamiento para una población celular específica. En algunas realizaciones, se incluyen citocinas antiinflamatorias, tales como IL-10 y TGF- β , sobre las partículas o en ellas, para limitar la activación del tipo de célula que está internalizando las partículas y para facilitar la inducción de tolerancia mediante energía y/o deleción y la activación de células T reguladoras. Se ha descubierto que la composición de las partículas influye en la cantidad de tiempo en la que las partículas persisten en el organismo y que la tolerancia requiere una rápida absorción y eliminación/degradación de las partículas. Dado que las proporciones de láctido:glicólido superiores a 50:50 reducen la velocidad de degradación, las partículas de la invención tienen una proporción de láctido:glicólido de aproximadamente 50:50 o inferior. En una realización, las partículas de la invención tienen una relación de D,L-láctido:glicólido de aproximadamente 50:50.

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

Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar lácteo, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosificación sólida de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Opcionalmente pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de una composición en la que solo se libere el/los principio(s) activo(s), o preferiblemente, en una parte determinada del tubo intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse, incluyen sustancias poliméricas y ceras. Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar lácteo, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las partículas modificadas también pueden estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes como se indicó anteriormente. Las formas de dosificación sólida de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos que controlan la liberación y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. En dichas formas de dosificación sólida, el compuesto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa y almidón. Dichas formas de dosificación también pueden comprender, como en la práctica normal, sustancias adicionales que no sean diluyentes inertes, p. ej., lubricantes para comprimidos y otros auxiliares para comprimidos, tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponantes. Opcionalmente pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de una composición que liberan solo las partículas modificadas, o preferiblemente, en una parte determinada del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

La presente invención abarca formulaciones tópicas farmacéuticamente aceptables de las partículas modificadas de la invención. La expresión "formulación tópica farmacéuticamente aceptable", como se emplea en esta memoria, significa cualquier formulación que sea farmacéuticamente aceptable para la administración intradérmica de micropartículas modificadas de la invención aplicando la formulación a la epidermis. En ciertas realizaciones de la invención, la formulación tópica comprende un sistema transportador. Los transportadores farmacéuticamente eficaces incluyen, pero sin limitación, disolventes (p. ej., alcoholes, poli alcoholes, agua), cremas, lociones, pomadas, aceites, emplastes, liposomas, polvos, emulsiones, microemulsiones y soluciones tamponadas (p. ej., solución salina tamponada o hipotónica) o cualquier otro transportador conocido en la técnica para la administración tópica de productos farmacéuticos. En los textos de referencia, que son convencionales en la técnica, se proporciona una lista más completa de transportadores conocidos en la técnica, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, decimosexta edición, 1980 y decimoséptima edición, 1985, ambas publicadas por Mack Publishing Company, Easton, Pa. En algunas otras realizaciones, las formulaciones tópicas de la invención pueden comprender excipientes. Para preparar las formulaciones tópicas farmacéuticamente aceptables de la invención se puede usar cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable conocido en la técnica. Los ejemplos de excipientes que pueden incluirse en las formulaciones tópicas de la invención incluyen, pero sin limitación, conservantes, antioxidantes, humectantes, emolientes, agentes tamponantes, agentes solubilizantes, otros agentes de penetración, protectores de la piel, tensioactivos y propulsores, y/o agentes terapéuticos adicionales utilizados en combinación con las partículas modificadas. Los conservantes adecuados incluyen, pero sin limitación, alcoholes, aminos cuaternarios, ácidos orgánicos, parabenos y fenoles. Los antioxidantes adecuados incluyen, pero sin limitación, ácido ascórbico y sus ésteres, bisulfito de sodio, hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado, tocoferoles y agentes quelantes como EDTA y ácido cítrico. Los humectantes adecuados incluyen, pero sin limitación, glicerina, sorbitol, polietilenglicoles, urea y propilenglicol. Los agentes tamponantes adecuados para su uso con la invención incluyen, pero sin limitación, tampones de ácido cítrico, clorhídrico y láctico. Los agentes solubilizantes adecuados incluyen, pero sin limitación, cloruros de amonio cuaternario, ciclodextrinas, benzoato de bencilo, lecitina y polisorbatos. Los protectores de la piel adecuados que pueden usarse en las formulaciones tópicas de la invención incluyen, pero sin limitación, aceite de vitamina E, alantoína, dimeticona, glicerina, vaselina y óxido de zinc.

En ciertas realizaciones, las formulaciones tópicas farmacéuticamente aceptables de la invención comprenden al menos las partículas modificadas de la invención y un agente potenciador de la penetración. La elección de la formulación tópica dependerá de diversos factores, entre los que se incluyen la afección que se va a tratar, las características fisicoquímicas del compuesto de la invención y otros excipientes presentes, su estabilidad en la formulación, el equipo de fabricación disponible y las limitaciones de los costes. Como se emplea en esta memoria, la expresión "agente potenciador de la penetración" significa un agente capaz de transportar un compuesto farmacológicamente activo a través del estrato córneo y al interior de la epidermis o dermis, preferiblemente, con poca o ninguna absorción sistémica. Se ha evaluado una amplia variedad de compuestos en cuanto a su eficacia para mejorar la tasa de penetración de los fármacos a través de la piel. Véase, por ejemplo, Percutaneous Penetration Enhancers, Maibach H. I. y Smith H. E. (eds.), CRC Press, Inc., Boca Ratón, Fla. (1995), que estudia el uso y analiza diversos potenciadores de penetración de la piel, y Buyuktimkin et al., Chemical Means of Transdermal Drug Permeation Enhancement in Transdermal and Topical Drug Delivery Systems, Gosh T. K., Pfister W. R., Yum S. I. (Eds.), Interpharm Press Inc., Buffalo Grove, Ill. (1997). En ciertas realizaciones ejemplares, los agentes de penetración para su uso con la invención incluyen, pero sin limitación, triglicéridos (p. ej., aceite de soja), composiciones de aloe (p. ej., gel de aloe vera), alcohol etílico, alcohol isopropílico, octilfenil polietilenglicol, ácido oleico, polietilenglicol 400, propilenglicol, N-decilmethylsulfóxido, ésteres de ácidos grasos (p. ej., miristato de isopropilo, laurato de metilo, monooleato de glicerol y monooleato de propilenglicol) y N-metilpirrolidona.

En ciertas realizaciones, las composiciones pueden estar en forma de pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, inhalantes o parches. En ciertas realizaciones ejemplares, las formulaciones de las composiciones según la invención son cremas, que puede contener además ácidos grasos saturados o insaturados, tal como ácido esteárico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido palmitoleico, alcoholes cetílicos u oleílicos, prefiriéndose particularmente el ácido esteárico. Las cremas de la invención también pueden contener un tensioactivo no iónico, por ejemplo, polioxil 40 estearato. En ciertas realizaciones, el componente activo se mezcla en condiciones estériles con un transportador farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o tampón necesario según sea necesario. La formulación oftálmica, gotas óticas y colirios, también se contemplan dentro del alcance de esta invención. Adicionalmente, la presente invención contempla el uso de parches transdérmicos, que tienen la ventaja añadida de proporcionar al organismo el suministro controlado de un compuesto. Dichas formas de dosificación se preparan disolviendo o dispensando el compuesto en el medio apropiado. Como se mencionó anteriormente, para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel, también pueden usarse agentes mejoradores de la penetración. La velocidad puede controlarse proporcionando una membrana que controla la velocidad o dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel.

Las partículas modificadas pueden administrarse por aerosol. Esto se realiza preparando un aerosol acuoso, una preparación liposomal o partículas sólidas que contienen las partículas modificadas. Se podría usar una suspensión no acuosa (p. ej., un propulsor de fluorocarbono).

Habitualmente, un aerosol acuoso se prepara formulando una solución o suspensión acuosa del agente junto con transportadores y estabilizadores convencionales farmacéuticamente aceptables. Los transportadores y estabilizadores varían con los requisitos del compuesto particular, pero normalmente incluyen tensioactivos no iónicos

(Tweens, Pluronic® o polietilenglicol), proteínas inocuas como seroalbúmina, ésteres de sorbitano, ácido oleico, lecitina, aminoácidos tales como glicina, tampones, sales, azúcares o alcoholes de azúcar. Generalmente, los aerosoles se preparan a partir de soluciones isotónicas.

5 También se apreciará que las partículas modificadas y las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular y emplear en terapias combinadas, esto es, los compuestos y las composiciones farmacéuticas pueden formularse con, o administrarse simultáneamente con, antes de o después de, uno o más procedimientos médicos o compuestos terapéuticos distintos deseados. La combinación particular de terapias (procedimientos o compuestos terapéuticos) a emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los compuestos terapéuticos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado que se obtendrá. También se
10 apreciará que las terapias empleadas pueden conseguir un efecto deseado para el mismo trastorno (p. ej., un compuesto de la invención puede administrarse simultáneamente con otro agente antiinflamatorio), o pueden conseguirse diferentes efectos (p. ej., control de cualquier efecto adverso).

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que contienen las partículas modificadas de la presente invención, comprenden además uno o más principios terapéuticamente activos adicionales (p. ej., antiinflamatorios y/o paliativos). Para los fines de la invención, el término "paliativo" se refiere al tratamiento que se centra en el alivio de los síntomas de una enfermedad y/o en los efectos secundarios de un régimen terapéutico, pero no es curativo. Por ejemplo, el tratamiento paliativo abarca analgésicos, medicamentos contra las náuseas y fármacos contra el mareo.
15

La invención proporciona métodos de regulación de una respuesta inmunitaria en un individuo, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, que comprende administrar al individuo las partículas modificadas descritas en este documento. Los métodos de inmunorregulación proporcionados por la invención incluyen los que suprimen y/o inhiben una respuesta inmunitaria innata o una respuesta inmunitaria adaptativa, incluyendo, pero sin limitación, una respuesta inmunitaria estimulada por polipéptidos inmunoestimuladores o componentes víricos o bacterianos.
20

Las partículas modificadas se administran en una cantidad suficiente para regular una respuesta inmunitaria. Como se describe en la presente memoria, la regulación de una respuesta inmunitaria puede ser humoral y/o celular, y se mide usando técnicas convencionales del campo técnico y como se describe en la presente memoria.
25

En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento se administran junto con (p. ej., en simultáneo con, antes o después de) un implante (p. ej., dispositivo) y/o trasplante (p. ej., tejido, células, órgano) para actuar como mediadoras, anular, regular y/o reducir la respuesta inmunitaria asociada a estas.

30 En ciertos casos de la descripción, el individuo padece un trastorno asociado a la activación inmunitaria no deseada, tal como una enfermedad o afección alérgica, alergia y asma. Un individuo que tiene una enfermedad alérgica o asma es un individuo con un síntoma reconocible de una enfermedad alérgica o asma existente. La tolerancia puede inducirse en dicho individuo, por ejemplo, mediante partículas formando complejos con los alimentos específicos (p. ej., proteínas de cacahuete, etc.), sustancias inyectadas (p. ej., proteínas de veneno de abeja, etc.) o sustancias inhaladas (p. ej., proteínas de polen de ambrosía, proteínas de caspa de mascotas, etc.) que suscitan la reacción alérgica.
35

En ciertas realizaciones, el individuo padece un trastorno asociado a la activación inmunitaria no deseada, tales como enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias. Un individuo que tiene una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria es un individuo con un síntoma reconocible de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria existente. La tolerancia puede inducirse en dicho individuo, por ejemplo, mediante partículas formando complejos con los autoantígenos relevantes que impulsan la enfermedad autoinmunitaria particular.
40

En ciertos casos de la descripción, el individuo padece un trastorno asociado a la terapia de reemplazo enzimático. La tolerancia puede inducirse en dicho individuo, por ejemplo, mediante partículas formando complejos con las enzimas que los pacientes con deficiencias genéticas no pueden producir, para impedir que produzcan respuestas de anticuerpos neutralizantes contra enzimas producidas de forma recombinante administradas para tratar su deficiencia particular, p. ej., tolerancia al factor VIII humano en pacientes con hemofilia debido a una deficiencia genética en la capacidad de producir factor VIII. Otro ejemplo puede incluir el reemplazo enzimático en afecciones tales como trastorno de acumulación de mucopolisacáridos, gangliosidosis, hipofosfatasa alcalina, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, hiperuricemia, deficiencia de la hormona del crecimiento, anemia renal o con trastornos de acumulación de lisosomas, incluida la enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Hurler, síndrome de Hunter, enfermedad de Maroteaux-Lamy, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Tay-Sachs y enfermedad de Pompe.
45
50

En ciertos casos de la descripción, el individuo padece una respuesta inmunitaria contundente o, de otra manera, adversa, hacia un agente administrado para el tratamiento de una enfermedad que compromete en realidad o posiblemente la salud o el tratamiento del paciente. Adicionalmente, los nuevos compuestos proporcionados por esta invención pueden proporcionarse a individuos que no muestran una respuesta inmunitaria a un agente pero que posiblemente pueden hacerlo en el futuro. En ciertos casos de la descripción, el individuo recibe terapia de reemplazo enzimático. En ciertos casos de la descripción, los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, agentes basados
55

en péptidos o proteínas, vacunas de ADN, ARNip, oligómeros de intercambio de sitio de corte y empalme y nanopartículas basadas en ARN. En algunos casos de la descripción, los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, Advate, factor antihemofílico, Kogenato, Elocato, proteína recombinante de fusión de factor VIII y Fc, Refacto, Novo VIIa, factor VII recombinante, eptacog alfa, Helixato, Monanina, Factor de coagulación IX, Wilate, Ceredasa, Alglucerasa, Cerezima, Imiglucerasa, Elelso, taliglucerasa alfa, Fabrazima, Agalsidasa beta, Aldurazima, 1-iduronidasa, Miozima, Glucosidasa ácida, Elaprasa, iduronato-2-sulfatasa, Naglazima arilsulfatasa B y N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa. En algunos casos de la descripción, al individuo se le administran agentes terapéuticos administrados para tratar enfermedades que incluyen, pero sin limitación, hemofilia, hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, Enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, enfermedad de Hurler, enfermedad de Pompe, Enfermedad de Hunter, trastorno de acumulación de mucopolisacáridos, gangliosidosis, hipofosfatasa alcalina, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, hiperuricemia, deficiencia de la hormona del crecimiento, anemia renal y enfermedad de Maroteaux-Lary.

En ciertos casos de la descripción, el individuo padece una afección autoinmunitaria huérfana. Dichas afecciones incluyen, pero sin limitación, púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía membranosa, penfigoide ampolloso, pénfigo vulgar y miastenia grave.

En ciertos casos de la descripción, el individuo padece un trastorno asociado a la terapia de la enfermedad. En el caso de anticuerpos recombinantes, se induce tolerancia, por ejemplo, a un anticuerpo humanizado que se emplea en un contexto terapéutico para evitar que un paciente produzca anticuerpos neutralizantes contra el anticuerpo terapéutico, p. ej., tolerancia a un anticuerpo que reduce drásticamente el subconjunto inmunitario humanizado o un anticuerpo anti citocina que se usa como tratamiento para una enfermedad autoinmunitaria.

Las enfermedades autoinmunitarias se pueden dividir en dos grandes categorías: organoespecíficas y sistémicas. Las enfermedades autoinmunitarias incluyen, aunque sin limitación, artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), diabetes mellitus de tipo I, diabetes mellitus de tipo II, esclerosis múltiple (EM), infertilidad mediada por el sistema inmunitario tal como insuficiencia ovárica prematura, esclerodermia, enfermedad de Sjogren, vitíligo, alopecia (calvicie), disfunción poliglandular, enfermedad de Graves, hipotiroidismo, polimiositis, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, enfermedad inflamatoria intestinal, incluida la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, hepatitis autoinmunitaria, incluida la asociada con el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis C (VHC), hipopituitarismo, enfermedad de injerto contra hospedador (EICH), miocarditis, enfermedad de Addison, enfermedades cutáneas autoinmunitarias, uveítis, anemia perniciosa, celiacía, hipoparatiroidismo, neuromielitis óptica, nefropatía membranosa, penfigoide ampolloso, pénfigo vulgar, miastenia grave.

Las enfermedades autoinmunitarias también pueden incluir, aunque sin limitación, tiroiditis de Hashimoto, síndromes poliglandulares autoinmunitarios de tipo I y tipo II, pénfigo paraneoplásico, penfigoide ampolloso, dermatitis herpetiforme, enfermedad por depósitos lineales de IgA, epidermolísis ampollosa adquirida, eritema nudoso, penfigoide gestacional, penfigoide cicatricial, crioglobulinemia esencial mixta, enfermedad ampollosa crónica de la infancia, anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica, síndrome de Goodpasture, neutropenia autoinmunitaria, miastenia grave, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, síndrome del hombre rígido, encefalomiелitis aguda diseminada, síndrome de Guillain-Barré, poliirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, neuropatía motora multifocal con bloqueo de conducción, neuropatía crónica con gammapatía monoclonal, síndrome de opsonoclono-mioclono, degeneración cerebelosa, encefalomiелitis, retinopatía, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, enteropatía sensible al gluten, espondilitis anquilosante, artritis reactivas, polimiositis/dermatomiositis, enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome de Bechet, psoriasis, poliarteritis nudosa, angeítis y granulomatosis alérgicas (enfermedad de Churg-Strauss), síndrome de superposición de poliangeítis, vasculitis por hipersensibilidad, granulomatosis de Wegener, arteritis temporal, arteritis de Takayasu, enfermedad de Kawasaki, vasculitis aislada del sistema nervioso central, tromboangeítis obliterante, sarcoidosis, glomerulonefritis y criopatías. Estas afecciones son muy conocidas en los campos médicos y se describen, por ejemplo, en Harrison's Principles of Internal Medicine, decimocuarta edición, Fauci A S et al., eds., Nueva York: McGraw-Hill, 1998.

En la técnica se conocen modelos animales para el estudio de enfermedades autoinmunitarias. Por ejemplo, Los modelos animales que parecen más similares a la enfermedad autoinmune humana incluyen cepas animales que desarrollan espontáneamente una alta incidencia de la enfermedad particular. Como ejemplos de dichos modelos se incluyen, pero sin limitación, el ratón diabético no obeso (NOD, *non obese diabetic*), que desarrolla una enfermedad similar a la de la diabetes de tipo 1 y animales propensos a enfermedades lúpicas, tales como ratones híbridos de Nueva Zelanda, MRL-Fas^{1Pr} y ratones BXSB. Como modelos animales en los que se ha inducido una enfermedad autoinmunitaria se incluyen, pero sin limitación, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), que es un modelo para la esclerosis múltiple, artritis inducida por colágeno (AIC), que es un modelo para la artritis reumatoide, el ratón transgénico con células T contra desmogleína 3, que puede usarse como un modelo experimental de pénfigo vulgar y uveítis autoinmunitaria experimental (UAE), que es un modelo para la uveítis. También se han creado modelos animales para enfermedades autoinmunitarias mediante manipulación genética e incluyen, por ejemplo, ratones con supresión génica (*knockout*) de IL-2/IL-10 para la enfermedad inflamatoria intestinal, supresión génica de Fas o ligando Fas para el LES (lupus eritematoso sistémico) y supresión génica del antagonista del receptor de IL-1 para la artritis reumatoide.

En ciertos casos de la descripción, el individuo padece una infección bacteriana o vírica. Un individuo que tiene una

infección bacteriana o vírica es un individuo con un síntoma reconocible de una infección bacteriana o vírica existente.

Una lista no limitativa de infecciones víricas que pueden tratarse con las partículas modificadas de la presente descripción, incluye infecciones por el virus del herpes, infecciones por el virus de la hepatitis, infecciones por el virus del Nilo occidental, infecciones por flavivirus, infecciones por el virus de la gripe, infecciones por rinovirus, infecciones por el virus del papiloma, infecciones por paromixovirus, infecciones por virus paragripales e infecciones por retrovirus. Los virus preferidos son aquellos virus que infectan el sistema nervioso central del sujeto. Los virus más preferidos son aquellos que causan fiebre hemorrágica, encefalitis o meningitis.

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

En algunas realizaciones, la invención se refiere a usos de las composiciones de esta invención antes de que aparezca la enfermedad. En otras realizaciones, la invención se refiere a usos de las composiciones de esta invención para inhibir la enfermedad en curso. En algunas realizaciones, la invención se refiere a mejorar una enfermedad en un sujeto. Se entiende que mejorar una enfermedad en un sujeto incluye el tratamiento, la prevención o la supresión de la enfermedad en el sujeto.

En algunas realizaciones, la invención se refiere a la prevención de la recaída de la enfermedad. Por ejemplo, en una región de un péptido (tal como un determinante antigénico) puede producirse una respuesta inmunitaria no deseada. La recaída de una enfermedad asociada a una respuesta inmunitaria no deseada puede producirse cuando se tiene un ataque de respuesta inmunitaria en una región diferente del péptido. Dado que las partículas inmunomodificadoras de la presente invención carecen de péptidos o restos antigénicos conectados, las partículas serán eficaces contra múltiples epítomos. Las respuestas de células T en algunos trastornos relacionados con respuestas inmunitarias, incluyendo la EM y otras enfermedades autoinmunitarias mediadas por Th1/17, pueden ser dinámicas y evolucionar durante el ciclo de una enfermedad recidivante-remitente y/o crónica progresiva. La naturaleza dinámica del repertorio de células T tiene implicaciones para el tratamiento de ciertas enfermedades, ya que la diana puede cambiar a medida que avanza la enfermedad. Anteriormente, el conocimiento preexistente del patrón de respuestas era necesario para predecir la evolución de una enfermedad. La presente invención proporciona composiciones que pueden prevenir el efecto de enfermedades de cambio dinámico, una función de "propagación epitópica". Un modelo conocido de recidiva es una reacción inmunitaria contra proteínas proteolipídicas (PLP) como un modelo para la esclerosis múltiple (EM). La respuesta inmunitaria inicial puede producirse por una respuesta contra PLP₁₃₉₋₁₅. La aparición posterior de la enfermedad puede producirse por una respuesta inmunitaria recidivante contra PLP[ρ]s-i β i.

Otros casos de la descripción se refieren al trasplante. Esto se refiere a la transferencia de una muestra de tejido o injerto de un individuo donante a un individuo receptor, y con frecuencia se realiza en receptores humanos que necesitan el tejido para restablecer una función fisiológica proporcionada por el tejido. Los tejidos que se trasplantan incluyen (pero sin limitación) órganos completos tales como riñón, hígado, corazón, pulmón; componentes de órganos tales como injertos de piel y la córnea del ojo; y suspensiones celulares tales como células de médula ósea y cultivos de células seleccionadas y expandidas de médula ósea o sangre circulante, y transfusiones de sangre completa.

Una posible complicación grave de cualquier trasplante se debe a diferencias antigénicas entre el receptor hospedador y el tejido injertado. Dependiendo de la naturaleza y del grado de la diferencia, puede existir el riesgo de una agresión inmunológica del injerto por el hospedador, o del hospedador por el injerto, pueden ocurrir ambas cosas. El alcance del riesgo se determina siguiendo el patrón de respuesta en una población de sujetos tratados de manera similar con un fenotipo similar, y correlacionando los diversos factores contribuyentes posibles según procedimientos clínicos bien aceptados. La agresión inmunológica puede ser el resultado de una respuesta inmunológica preexistente (tal como un anticuerpo preformado), o una que se inicia aproximadamente en el momento del trasplante (tal como la generación de células Th). Los anticuerpos, las células Th o las células Tc pueden estar implicados en cualquier combinación entre sí y con diversas moléculas y células efectoras. Sin embargo, generalmente, no se conocen los antígenos que están implicados en la respuesta inmunitaria, por lo tanto, se plantean dificultades para diseñar terapias específicas de antígeno o inducir tolerancia específica de antígeno.

Ciertos casos de la descripción se refieren a la disminución del riesgo de la enfermedad de injerto contra hospedador, que conduce al rechazo del injerto de tejido por el receptor. El tratamiento puede realizarse para impedir o reducir el efecto de una respuesta de rechazo hiperaguda, aguda o crónica. El tratamiento se inicia preferiblemente con suficiente antelación al trasplante para que cuando se implante el injerto ya haya tolerancia; pero cuando esto no es posible, el tratamiento puede iniciarse simultáneamente con el trasplante o después del mismo. Independientemente del tiempo de inicio, generalmente, el tratamiento continuará a intervalos regulares durante al menos el primer mes después del trasplante. En caso de que el injerto se adapte bien no se requieren dosis de seguimiento, pero pueden reanudarse si hay pruebas de rechazo o inflamación del injerto. Por supuesto, los procedimientos de tolerización de esta descripción pueden combinarse con otras formas de inmunosupresión para lograr un nivel de riesgo incluso más bajo.

- 5 Ciertos casos de la descripción se relacionan con la disminución o, de otra manera, con la mejora de la respuesta inflamatoria inducida como respuesta a la cirugía. En un caso de la descripción, las partículas inmunomodificadoras se administran antes de la cirugía. En un caso adicional de la descripción, las partículas inmunomodificadoras se administran simultáneamente con la cirugía o durante la misma. En otro caso adicional de la descripción, las partículas inmunomodificadoras se administran después de la cirugía.
- Las partículas de la descripción también pueden usarse para tratar abscesos o empiemas para disminuir la respuesta inflamatoria producida en el sujeto después de la exposición a agentes infecciosos tales como bacterias o parásitos. En un caso de la descripción, las partículas inmunomodificadoras se administran junto con tratamientos antibacterianos y/o antiparasitarios conocidos en la técnica.
- 10 Las partículas de la descripción también pueden usarse para disminuir o, de otra manera, mejorar la respuesta inflamatoria inducida como una respuesta a un traumatismo o daño físico que incluye, pero sin limitación, una lesión deportiva, una herida, lesión de la médula espinal, una lesión cerebral y/o una lesión de tejidos blandos. En un caso de la descripción, las partículas inmunomodificadoras se administran después de que el sujeto experimente un traumatismo o una lesión.
- 15 Las partículas de la descripción también pueden usarse para disminuir la respuesta inflamatoria asociada al desarrollo y/o crecimiento de células cancerosas. Los cánceres que pueden tratarse incluyen, pero sin limitación, cáncer del sistema nervioso central, carcinoma de células basales, tumores cerebrales cancerosos, linfoma de Burkitt, linfoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de hígado, cáncer de pulmón microcítico y no microcítico, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon y recto, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (células renales), leucemia, linfoma no Hodgkin, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, melanoma y cáncer de tiroides. En un caso de la descripción, la inyección subcutánea de las partículas de la descripción impide la acumulación de neutrófilos inhibidores, disminuyendo así la inflamación en el paciente con cáncer.
- 20 Las partículas de la descripción también son útiles para la regeneración de tejido dañado. En un caso de la descripción, la administración de las partículas a un paciente aumenta la regeneración de las células epiteliales dañadas en el tubo digestivo. En un caso adicional de la descripción, el paciente padece colitis, enfermedad de Crohn o enfermedad inflamatoria intestinal. En otros casos de la descripción, la administración de las partículas de la descripción a un paciente aumenta la remielinización de las neuronas. En casos adicionales de la descripción, el paciente sufre de esclerosis múltiple.
- 25 En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención (p. ej., transportador de PLG acoplado a una molécula antigénica) encuentran uso con uno o más armazones, matrices y/o sistemas de suministro (véase, p. ej., la solicitud de patente de Estados Unidos 2009/0238879; y las patentes de Estados Unidos N.º 7 846 466, 7 427 602, 7 029 697, 6 890 556, 6 797 738 y 6 281 256. En algunas realizaciones, las partículas (p. ej., partículas de PLG acopladas a antígeno) están asociadas con, adsorbidas en, embebidas dentro, conjugadas con, etc. un armazón, una matriz y/o un sistema de suministro (p. ej., para el suministro de material químico/biológico, células, tejido y/o un órgano a un sujeto). En algunas realizaciones, un armazón, una matriz y/o un sistema de suministro (p. ej., para el suministro de material químico/biológico, células, tejido y/o un órgano a un sujeto) comprende y/o está fabricado de materiales descritos en el presente documento (p. ej., PLG conjugado con uno o más péptidos antigénicos).
- 30 En algunas realizaciones, se proporcionan armazones microporosos (p. ej., para trasplantar material biológico (p. ej., células, tejido, etc.)) en un sujeto. En algunas realizaciones, se proporcionan armazones microporosos que tienen agentes en su interior (p. ej., proteínas de la matriz extracelular, exendina-4) y material biológico (p. ej., células de los islotes pancreáticos). En algunas realizaciones, los armazones se usan en el tratamiento de enfermedades (p. ej., diabetes de tipo 1) y métodos relacionados (p. ej., métodos de diagnóstico, métodos de investigación, exploración de fármacos). En algunas realizaciones, los armazones se proporcionan con los transportadores conjugados con antígeno descritos en este documento sobre y/o dentro del armazón. En algunas realizaciones, los armazones se producen a partir de materiales conjugados con antígeno (p. ej., PLG conjugado con antígeno).
- 35 En algunas realizaciones, un armazón y/o sistema de suministro comprende una o más capas y/o tiene una o más entidades/agentes químicos y/o biológicos (p. ej., proteínas, partículas conjugadas con péptidos, moléculas pequeñas, células, tejido, etc.), véase, p. ej., la solicitud de patente de Estados Unidos 2009/0238879. En algunas realizaciones, las partículas acopladas a antígeno se administran conjuntamente con un sistema de suministro de armazón para suscitar la inducción de la tolerancia inmunológica al armazón y a los materiales asociados. En algunas realizaciones, el armazón microporoso se administra a un sujeto con las partículas descritas en este documento sobre o dentro del armazón. En algunas realizaciones, las partículas acopladas a antígeno están acopladas a un sistema de suministro de armazón. En algunas realizaciones, un sistema de suministro de armazón comprende partículas acopladas a antígeno.
- 40 Aunque se han descrito realizaciones específicas, debe entenderse que la invención según se reivindica no debe considerarse limitada indebidamente a dichas realizaciones específicas. Por ejemplo, las solicitudes de patente de Estados Unidos 2012/0076831, 2002/0045672, 2005/0090008, 2006/0002978 y 2009/0238879 y las patentes de Estados Unidos N.º 7 846 466; 7 427 602; 7 029 697; 6 890 556; 6 797 738; y 6 281 256 proporcionan detalles, modificaciones y variaciones que encuentran uso en diversas realizaciones descritas en el presente documento. El
- 45
- 50
- 55

alcance de las reivindicaciones define la invención.

Ejemplos

5 Para ilustrar adicionalmente las ventajas y características de la descripción y de la invención, se proporcionan los siguientes ejemplos sin que pretendan limitar el alcance de esta descripción. Como referencia se proporcionan ejemplos no relacionados con partículas de gliadina.

Materiales y métodos

Generación de ratones quiméricos

10 Con una dosis de 950 rads, se irradiaron ratones B6.SJL-Ptprc^aPep3^b/BoyJ (CD45.1) de seis a ocho semanas de vida. Doce horas después, los ratones se reconstituyeron con 10⁷ células de médula ósea de donantes C57BL/6-7.2fms-EGFP. Los ratones recibieron sulfametoxazol (Sigma Aldrich) y trimetoprima (Sigma Aldrich) en el agua potable durante 10 días después de la irradiación. Seis semanas después de la irradiación, los ratones se infectaron con VNO (virus del Nilo occidental), como se describe anteriormente. El quimerismo se verificó usando citometría de flujo y se descubrió que, invariablemente, era 96-99 % de origen donante como se demostró previamente (Getts et al., J. Neurochem. 103: 1019, 2007).

15 *Inmunohistología*

20 Los ratones se anestesiaron y perfundieron con 50 ml de PBS estéril. Salvo el corazón, que se procesó en bloques de parafina (Getts et al., J. Neurochem 103:10919- 1030, 2007), todos los órganos se aislaron y se congelaron rápidamente en Compuesto de Temperatura de Corte Óptima (OCT; Tissue-Tek, Tokio, Japón). En un microtomo criostático se cortaron secciones de tejido de ocho micrómetros, se secaron al aire durante la noche y después se conservaron a -80 °C hasta utilizarlos. Las secciones congeladas se descongelaron y se realizó histología (tinción convencional con hematoxilina y eosina) o inmunohistoquímica (Getts et al., J. Exp Med 205:2319-2337, 2008). Como se indica, se utilizaron los siguientes anticuerpos contra MARCO: SIGN-R1 y SIGLEC-1 (R&D Systems, MN, USA), CD68 (Abeam, MA, USA) y Ki67 (Abeam). Las imágenes se adquirieron con un microscopio Olympus BX-51 utilizando una cámara DP-70 y el programa informático DP manager 2.2.1 (Olympus, Tokio, Japón).

25 *Microscopio y adquisición de imágenes*

Las imágenes se adquirieron con un microscopio Olympus BX-51 (Olympus, Japón), utilizando una cámara DP-70 y el programa informático DP manager 2.2.1 (Olympus).

Aislamiento de leucocitos del cerebro y el hígado

30 Como se describió anteriormente (Getts et al, J Exp Med. 29: 2319, 2007) se obtuvieron leucocitos de los cerebros de ratones perfundidos con PBS digiriendo cerebros durante 60 minutos a 37 °C en PBS con desoxirribonucleasa (0,005 g/ml; Sigma Aldrich) y colagenasa IV (0,05 g/ml; Sigma Aldrich). La digestión se detuvo con FCS al 10 % y el homogeneizado se pasó a través de un tamizador celular de nailon de 70 µm (Becton Dickinson, NJ, USA). El sedimento, obtenido después de 10 minutos de centrifugación a 340xg, se resuspendió en Percoll al 30 % (Amersham, Noruega) y se aplicó sobre Percoll al 80 %. después centrifugar a 1 140xg durante 25 minutos a temperatura ambiente, se recogieron leucocitos de la interfaz de 30 %/80 %. Para obtener leucocitos del hígado, también se utilizó el mismo protocolo, pesando el tejido antes de su procesamiento.

Aislamiento de leucocitos del bazo, sangre y médula ósea

40 Para el análisis por citometría de flujo, se diseccionó el fémur derecho y, usando jeringas cargadas con PBS, se enjuagaron las células de la médula ósea. Para el aislamiento de precursores de médula ósea, se utilizaron fémures y tibias de al menos 4 ratones. La suspensión celular obtenida después enjuagar se filtró a través de un tamizador celular de 70 µm y se centrifugó durante 5 minutos a 340 g. Los glóbulos rojos presentes en el sedimento resultante se sometieron a lisis en tampón de lisis de glóbulos rojos basado en NH₄Cl (BD Pharm Lyse™; BD Pharmingen), antes de la centrifugación durante 5 minutos a 340xg. En el caso de sangre periférica, se recogió sangre mediante punción cardíaca y se transfirió inmediatamente a tampón de citrato (mMol, Sigma Alrich). La suspensión resultante se aplicó sobre Percoll al 70 % y se centrifugó a 1 140xg durante 20 minutos a temperatura ambiente con el freno apagado. Se recogió la interfaz y las células se lavaron una vez en PBS y se centrifugaron a 340xg. Para el aislamiento de leucocitos esplénicos, los bazos se pasaron a través de un tamizador celular de 7070 µm y se centrifugaron durante 5 minutos a 340 g. Los glóbulos rojos presentes en el sedimento resultante se sometieron a lisis en tampón de lisis de glóbulos rojos basado en NH₄Cl (BD Pharm Lyse™; BD Pharmingen), antes de la centrifugación durante 5 minutos a 340xg.

50 *Citometría de flujo*

Las células recogidas (como se describe anteriormente) del cerebro, hígado, sangre y médula ósea, se lavaron en PBS y se bloquearon con anticuerpo anti CD 16/CD32 (Biolegend). Las células viables se contaron usando tinción por exclusión de azul de tripano, mostrando habitualmente una viabilidad celular >95 %.

Se midió la expresión de la molécula de la superficie celular y se llevaron a cabo clasificaciones de células en un FACS ARIA (Becton Dickinson), equipado con un láser de iones de argón y HeNe (helio-neón). Las poblaciones viables se seleccionaron mediante dispersión directa y lateral y, después de esto, se identificaron poblaciones fluorescentes determinadas por selección directa. La clasificación se llevó a cabo utilizando parámetros específicos de fluorescencia y dispersión que identifican la población de interés. La clasificación de rigurosidades se estableció hasta la pureza para obtener una pureza >98 % para las poblaciones de médula ósea.

Los archivos de datos FACS adquiridos se analizaron utilizando el programa de citometría de flujo, Flow Jo (FlowJo, Ashland, OR, USA). La cuantificación de las poblaciones celulares de interés se calculó en función de los porcentajes de citometría de flujo en el análisis y el recuento absoluto de células de cada órgano.

10 *Transferencia adoptiva*

Durante el desarrollo de las realizaciones de la presente invención se llevaron a cabo experimentos para investigar un segundo modelo de enfermedad activa denominada transferencia adoptiva. En lugar de inmunizar a los animales con el péptido, los linfocitos del bazo de los ratones con enfermedad activa, se transfirieron a un receptor, quien posteriormente desarrollaría la enfermedad. Durante el desarrollo de las realizaciones de la presente invención se llevaron a cabo experimentos para caracterizar la capacidad de las nanopartículas de PLG para desactivar las células efectoras activadas transferidas de manera adoptiva. Los ratones tratados con partículas o esplenocitos acoplados con un péptido de control, tuvieron un aumento en la puntuación clínica a partir del día 4. Los ratones tratados con partículas de PLG-PLP₁₃₉₋₁₅₁ el día 2 tuvieron una puntuación clínica media de 0 para todos menos dos momentos hasta el día 40, y la puntuación clínica media para esos otros momentos fue de 0,25.

20 *ELISA Multiplex*

Se realizaron ensayos ELISA con placas multiplexadas acorde con las instrucciones del fabricante (Quansys Biosciences, Logan, Utah, USA). Resumiendo, tejido de cerebro, bazo e hígado se homogeneizó en PBS, se clarificó mediante un centrifugado a 1000xg y se conservó a -20 °C hasta realizar el ensayo. También se usaron muestras de suero. Las muestras descongeladas y los patrones se diluyeron en el tampón suministrado y 30 µl de cada uno de ellos se sembraron en cada pocillo que contenía 16 puntos, conteniendo cada uno de ellos un anticuerpo de captura para una proteína soluble particular. Después, las placas se incubaron durante 1 hora en un agitador orbital a 120 rpm. Las placas se lavaron 3 veces, y se añadieron 30 µl de anticuerpo de detección a cada pocillo y se incubaron durante otra hora. Después de lavar 3 veces, se añadió estreptavidina-HRP y se incubó durante 15 minutos más. Después, las placas se lavaron 6 veces y se añadió la mezcla de sustrato. Las placas se leyeron inmediatamente en un reproductor de imágenes CCD (Kodak, Rochester NY, USA). Las imágenes de las placas se analizaron usando el programa informático Quansys Q-view (Quansys Biosciences).

Inducción y evaluación de la encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE)

Los ratones recibieron inyección subcutánea de una emulsión que contenía péptido MOG 0,1 mg (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK (SEQ ID NO: 1); Auspep Parkville Victoria, Australia; purificado mediante HPLC a >95 %) y adyuvante completo de Freund que contenía *Mycobacterium tuberculosis* 2 mg/ml (Sigma Aldrich). Dos días después, los ratones recibieron por vía i.p. una administración de toxina toserínica de 500 µl (Sigma Aldrich). La progresión de la enfermedad de los ratones se monitorizó y se clasificaron en la siguiente escala: 1, cola flácida y/o debilidad de 1 extremidad posterior; 2, debilidad en más de una extremidad, trastorno de la marcha; 3, parálisis en 1 extremidad; 4, parálisis en más de una extremidad, incontinencia; 5, moribundo.

40 *Datos estadísticos*

Se realizaron gráficos y el análisis estadístico computarizado se efectuó en GraphPad Prism e InStat, respectivamente (ambos programas del soporte lógico GraphPad, San Diego, CA, USA). Dependiendo de los datos, se realizó una prueba t de Student bilateral para datos independientes o un ANOVA unidireccional con una prueba de Tukey-Kramer posterior, teniendo en cuenta que un valor de P <0,05 es significativo.

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

Ejemplo 1

Preparación de partículas inmunomodificadoras con carga negativa (IMP)

50 A una solución de poli(anhídrido maleico-etileno) (PEMA) en D₂O (4 ml, 1 % p/v) se añadió por goteo una solución de ácido poli(láctido-co-glicólico) (PLG) en diclorometano (DCM) (2 ml, 20 % p/v). La mezcla se sometió a ultrasonidos en hielo a 16 vatios durante 30 segundos usando el procesador ultrasónico VC 30. Después, el crudo homogeneizado resultante se vertió en una solución de D₂O (200 ml que contenía 0,5 % p/v de PEMA). La suspensión homogeneizada se dejó agitando durante la noche a una velocidad de 3,5 usando un agitador magnético Bellco Glass, Inc., Bellstir Multistir 9 (10 W durante 10 s, 16 W durante 10 s, 16 W durante 30 s).

Resultados

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

- 5 a. 10 W, 10 s - promedio Z = 499,9 nm - Pdl = 0,23, Pico = 634,5 nm
- b. 16 W, 10 s - promedio Z = 528,9 nm - Pdl = 0,227, Pico = 657,5 nm
- c. 16 W, 30 s - promedio Z = 471,6 nm - Pdl = 0,228, Pico = 580,5 nm
- d. 16 W, 60 s - promedio Z = 491,1 nm - Pdl = 0,275, Pico = 600,8 nm

Después de finalizar la reacción, la suspensión resultante en crudo se purificó. *Purificación*

10 El agua pesada (D₂O) reciente y el tampón de bicarbonato de sodio 10x se enfriaron durante la noche a 4 °C. Usando un filtro celular de 40 µm, se filtraron 36 ml de suspensión de partículas de cada lote en un tubo de centrifuga de 50 ml debidamente marcado que contenía 4 ml de tampón de bicarbonato 10x frío. Cada vaso de precipitados produjo aproximadamente 6 tubos de este tipo. Todos los tubos se centrifugaron durante aproximadamente 15 minutos a 7 000 g a 4 °C y se aspiró el sobrenadante. La preparación de la suspensión se repitió usando el procedimiento mencionado anteriormente y gran parte de los sedimentos de partículas se suspendieron como sea posible en 1 ml de D₂O fría.

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

La resuspensión de las partículas se repitió hasta que todos los sedimentos de partículas se resuspendieron satisfactoriamente. (Etapa 2)

20 Después, los 6 tubos centrifugos se combinaron en un tubo de centrifuga (tubo de 50 ml) y el tubo se llenó con el volumen restante de D₂O fría (lavado 1) hasta 40 ml.

El tubo se centrifugó durante 20 minutos a 7 000 g a 4 °C y se aspiró el sobrenadante.

25 Las etapas 1 y 2 y el lavado 1 de la partícula resultante se repitieron cada vez al menos dos veces más. Finalmente, los sedimentos de partículas resultantes se sometieron después a una congelación instantánea en nitrógeno líquido y se liofilizaron hasta a la sequedad en el colector para obtener IMP con carga negativa.

30 En la figura 1 se muestra la caracterización de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie mediante análisis de dispersión dinámica de luz. Las partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en superficie se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) a una velocidad de recuento de 2,5 x 10⁵ cuentas por segundo en agua a 18,2 Mω. La población de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie tenía un diámetro promedio Z de 567 nm, un diámetro pico de 670 nm y un índice de polidispersidad de 0,209.

35 En la Tabla 4 se muestra las mediciones de las partículas de PLG-PEMA funcionalizadas en la superficie. Los datos de la tabla son representativos, ya que cada lote es ligeramente diferente. Sin embargo, los números de la tabla se basaron en la combinación de varios lotes de partículas. Las mediciones de las partículas de doble emulsión son similares a las de la Tabla 2.

Tabla 4 -Mediciones de las partículas de PLG-PEMA funcionalizadas en la superficie

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

Ejemplo 2

La administración de perlas de PLGA acopladas a antígeno previene la encefalitis autoinmunitaria experimental recidivante

40 Las nanopartículas de PLG se investigaron con el epítipo PLP₁₃₉₋₁₅₁ de la proteína proteolipídica inmunodominante (PLG-PLP₁₃₉₋₁₅₁) para inducir tolerancia para la prevención de la encefalitis autoinmunitaria experimental recidivante (EAE-R). Se generaron ratones con EAE-R como se describe anteriormente.

45 Los péptidos administrados a los animales se acoplaron a partículas con un diámetro medio de 500 nm. Los ratones se trataron con PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLGA (N=5), OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLGA (N=5) o PLGA no conjugado (N=5) el día -7 en relación con el momento de la inmunización (día 0). Normalmente, el pico de la enfermedad se observó aproximadamente del día 12 al 14, y los ratones se puntuaron con respecto a la enfermedad clínica. Las partículas sin péptido, o modificadas con el péptido de control OVA₃₂₃₋₃₃₉, no previnieron la inducción de la enfermedad. Sin embargo, de ninguna manera las partículas de PLGA modificadas con PLP₁₃₉₋₁₅₁ produjeron una puntuación clínica de 0 (sin enfermedad)

exceptuando las puntuaciones clínicas bajas inferiores a 1 presentadas entre los días 20 y 30 (Figura 2). Estudios previos con PLG no modificado o usando partículas de poliestireno, no produjeron esta reducción eficaz de la enfermedad, con partículas unidas a poliestireno que normalmente desencadenan anafilaxia.

5 Asimismo, la inactivación específica de células T CD4⁺ específicas de mielina se demostró por la ausencia de respuestas de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) en los dos epítomos de PLP₁₃₉₋₁₅₁ inmunizantes. Considerado en conjunto, el tratamiento profiláctico con PLG-PLP₁₃₉₋₁₅₁ el día 7 previno específicamente el desarrollo de EAE y representó una mejora en la capacidad de las partículas para prevenir la enfermedad. Las puntuaciones producidas con las partículas son tan buenas, y tal vez mejores, que las puntuaciones producidas con esplenocitos acoplados a antígeno.

10 El tipo de partícula administrada también tiene un efecto sobre el desarrollo de EAE en el modelo de ratón. Los ratones se trataron con OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLS (N=5), OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG_Aphosporex (N=5), OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG_APEMA (N=5), PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLA (N=5), PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG_Aphosporex (N=5) o PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG_Apema (N=5) el día -7 en relación con el momento de la inmunización (día 0). Normalmente, el pico de la enfermedad se observó aproximadamente del día 12 al 14, y los ratones se puntuaron con respecto a la enfermedad clínica. Las partículas de cualquier composición, que se
15 modificaron con el péptido de control OVA₃₂₃₋₃₃₉, no previnieron la inducción de la enfermedad. Sin embargo, las perlas de PLG acopladas a PLP₁₃₉₋₁₅₁ fueron más eficaces en la inducción de la regulación negativa de la EAE-R que el PLG comercial (Phosphorex)acoplado a PLP₁₃₉₋₁₅₁ o poliestireno (Figuras 3A y 3B).

Ejemplo 3

20 *La infusión intravenosa de partículas de PLG acopladas con antígeno no induce descenso de temperatura inducido por anafilaxia en animales previamente sensibilizados con OVA/Alumbre*

Debido a la presencia de enfermedad activa, la anafilaxia a los antígenos es un tema de interés, lo que podría dar como resultado mortalidad inmediata, y se ha descrito con partículas unidas a poliestireno. La anafilaxia se asocia a una disminución significativa de la temperatura corporal. Para analizar si la administración intravenosa de OVA-PLG induce una disminución de temperatura inducida por anafilaxia en animales previamente sensibilizados, los ratones
25 se inmunizaron el día 0 con OVA/Alumbre 10 µg mediante inyección intraperitoneal. El día 14, los ratones se inmunizaron de nuevo con OVA/Alumbre 10 µg mediante inyección intraperitoneal, y después se tolerizaron con OVA-PLG administrado por vía intravenosa el día 21. Después, el día 28, los ratones se tolerizaron con partículas de PLG-OVA o con OVA mediante administración intravenosa.

30 Como se muestra en la Figura 4, los ratones tratados con OVA soluble el día 28 presentaron una disminución de la temperatura en comparación con la de los animales tratados con la partícula de PLG-OVA. No se observó disminución de la temperatura corporal al cabo de 1 hora de suministrar las partículas.

En la figura 5 se muestra que la administración de PLP-PLG durante la remisión no da como resultado mortalidad asociada a anafilaxia. La EAE se indujo en ratones hembra SJL/J de seis a ocho semanas de vida mediante inyección subcutánea de PLP₁₃₉₋₁₅₁ en CFA, y el desarrollo de la enfermedad clínica se monitorizó y registró (Figura 5B). El día
35 21, en relación con la inducción de la enfermedad, los ratones recibieron inyecciones iv de PLP₁₃₉₋₁₅₁ soluble (cuadrados de color blanco), OVA₃₂₃₋₃₃₉ soluble (círculos de color blanco), o los mismos péptidos acoplados a nanopartículas de PLG (color negro). La temperatura de los animales se monitorizó y se registró cada 10 minutos durante 1 hora después de la inyección (Figura 5A).

Ejemplo 4

40 *El tratamiento profiláctico con partículas de PLP-PLG induce tolerancia específica de antígeno prolongada*

La dosificación óptima se determinó mediante administración intravenosa de concentraciones crecientes de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG siete días antes de la inducción de la enfermedad, y se monitorizó con respecto al desarrollo de la enfermedad clínica en comparación con el de ratones SJL/J tratados con OVA₃₂₃₋₃₃₉-PEG (Figura 6A). Ratones hembra SJL/J de seis a ocho semanas de vida recibieron inyección iv de nanopartículas de PLG acopladas o bien a PLP₁₃₉₋₁₅₁
45 (cuadrados) o a OVA₃₂₃₋₃₃₉ (círculos). La EAE se indujo por inyección subcutánea de PLP₁₃₉₋₁₅₁ en CFA 7 días (Figura 6B), 25 días (Figura 6C) o 50 días (Figura 6D) más tarde. Durante 100 días se efectuó un seguimiento de la enfermedad clínica de los animales del panel B. En la Figura 6E se muestra que, el día 8 en relación con la inducción de la enfermedad, se llevó a cabo una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) en un subconjunto de los ratones mostrado en el panel B. Los oídos de los animales representativos seleccionados de los grupos sensibilizados con PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA en el panel B (OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG y PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG) se expusieron al epítomo PLP₁₃₉₋₁₅₁ y al péptido de control OVA₃₂₃₋₃₃₉. La inflamación de oídos, como medida de DTH, se determinó 24 h más tarde y se sustrajeron las respuestas antes de la exposición. En la Figura 6F se muestran ratones hembra SJL/J de seis a ocho semanas de vida que recibieron inyección por vía intravenosa de nanopartículas de PLG acopladas a PLP₁₇₈₋₁₉₁ (triángulos),
50 OVA₃₂₃₋₃₃₉ (círculos) o PLP₁₃₉₋₁₅₁ (cuadrados), o solo partículas no acopladas (círculos delineados). La EAE se indujo 7 días después por inyección subcutánea de PLP₁₇₈₋₁₉₁ en CFA, y la enfermedad se monitorizó en los momentos mostrados.

Ejemplo 5

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

5 Durante el desarrollo de las realizaciones de la presente invención se llevaron a cabo experimentos para investigar la capacidad de las partículas de PLG-PLP₁₃₉₋₁₅₁ para *tratar* la enfermedad en lugar de prevenirla, y determinar si la vía de administración afectaba al desarrollo de la enfermedad. Los ratones se inmunizaron el día 0 con PLP₁₃₉₋₁₅₁ y un adyuvante. Normalmente, los ratones tienen puntuaciones clínicas máximas los días 12-14. En este modelo, los ratones se trataron el día 10 con las partículas de PLG-PLP₁₃₉₋₁₅₁ o con las partículas de PLG-OVA₃₂₃₋₃₃₉ de control mediante administración intravenosa (iv), administración intraperitoneal (ip), administración subcutánea (sc), o por vía oral. Como se muestra en la Figura 7, la tolerancia profiláctica es más eficaz cuando las partículas de PLG-PLP₁₃₉₋₁₅₁ se administran por vía intravenosa o intraperitoneal. Los animales tratados con PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG administrado por vía intravenosa, no desarrollaron la enfermedad y la media de sus puntuaciones clínicas fue de 0 en la mayor parte de los momentos. Esto contrasta con los animales tratados con partículas de poliestireno PLP₁₃₉₋₁₅₁, por lo cual se observó que >70 % de los animales moría por anafilaxia.

Ejemplo 6

15 *La tolerancia de partículas acopladas a antígeno inhibe la inducción de respuestas Th1 y Th17 específicas de antígeno en la encefalitis autoinmunitaria experimental recidivante activa*

Para determinar si la administración de partículas acopladas a antígeno inhibe la inducción de células T auxiliares, ratones BALB/c recibieron por vía intravenosa el día -7 una administración de partículas de MOG₃₅₋₅₅-PLG u OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG. El día 0, los ratones recibieron por vía subcutánea una administración de partículas OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG y adyuvante completo de Freund (CFA). Los animales se reestimularon con partículas MOG₃₅₋₅₅-PLG u OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG el día 10 y se aislaron las células de drenaje de ganglios linfáticos. El CPM y los niveles de IL-17, GM-CSF, IFN- γ , IL-10 e IL-4, se midieron el día 10. Como se muestra en la Figura 8, La administración de partículas OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG inhibió las respuestas de Th1 y Th17 en los animales tratados.

EJEMPLO 7

Las partículas de PLGA acopadas a PLP₁₃₉₋₁₅₁ inducen tolerancia

25 Se realizó una estrategia de tolerancia terapéutica adicional suministrando a los ratones PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG u OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG. El análisis histológico mostró que la administración de partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG inhibe la inflamación y la desmielinización de la médula espinal cervical. Los ratones se trataron con PLP-PLG u OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG y el día 40 se recuperó el tejido. La médula espinal cervical se aisló y seccionó para investigar la respuesta inmunitaria en el SNC, que es la base de la patología de la EAE-R y de la esclerosis múltiple. En la Figura 9 se muestra una reducción en la infiltración de células inmunitarias en la médula espinal de los animales tratados con PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG que era más similar a la del tejido nativo que a la del tejido de los animales tratados con OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG. La tinción de los animales tratados con OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG fue positiva para CD45, CD4 y CD11b; mientras que la de los animales tratados con PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG fue mínima para estos factores.

35 La administración de partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG también inhibe la alteración de la barrera hematoencefálica (BHE) y la activación de macrófagos en la médula espinal de los ratones tratados. Los animales se trataron con adyuvante completo de Freund (CFA), con partículas de OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG o con partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG. Se determinaron las puntuaciones clínicas y el porcentaje de incidencia de EAE (Figura 10B) y se observaron las médulas espinales mediante imágenes *in vivo* (Figuras 10A y 11). Angiosense mide la filtración vascular en el SNC y Prosense informa sobre macrófagos activados (la activación de la catepsina escinde al indicador que revela la señal fluorescente). Los gráficos de barras proporcionan las cifras numéricas con respecto a la intensidad de la señal mostrada en las exploraciones de cerebro y SC.

40 La tolerancia también puede inducirse con partículas en las que se ha encapsulado el antígeno. En la Figura 12 se muestra que la administración de partículas de PLG, en las que se ha encapsulado PLP₁₃₉₋₁₅₁, inhibe la inducción de EAE-R en ratones. La capacidad de encapsular autoantígenos permite el uso de mezclas complejas de proteínas o incluso homogeneizados de órganos para permitir una mayor cobertura antigénica y, por lo tanto, abordar de manera más eficaz la propagación epitópica.

Ejemplo 8

La tolerancia inducida por partículas de PLAG acopladas a PLP₁₃₉₋₁₅₁ depende parcialmente de la expansión/activación de células T reguladoras

50 Ratones SJL/J se trataron con un anticuerpo anti CD25, un marcador habitual de células T reguladoras (Tregs), el día -9, y después, el día -7, se trataron con partículas de OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG y anticuerpo anti CD25, partículas de OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLG y un anticuerpo de IgG de control, partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG y un anticuerpo anti CD25, o partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG y un anticuerpo de IgG de control. Como se muestra en la Figura 13, los animales tratados con las partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG y con el anticuerpo anti CD25 demostraron, a veces, una puntuación clínica media más alta que la de los animales tratados con partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG y un anticuerpo de IgG de control. Esto confirma que las Tregs, o al menos las células T que expresan CD25, desempeñan un papel en el inicio de la tolerancia.

Ejemplo 9*Las partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG inducen tolerancia terapéutica en la EAE activa y adoptiva*

La tolerancia terapéutica inducida por partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG se compararon en la EAE activa y adoptiva. La EAE adoptiva se indujo en ratones hembra SJL/J de seis a ocho semanas de vida mediante transferencia adoptiva de 2,5x10⁶ blastos activados con PLP₁₃₉₋₁₅₁. Los ratones recibieron inyección iv de PLP₁₃₉₋₁₅₁ (cuadrados) o de péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ (círculos) acoplado a nanopartículas de PLG 500 nm, 2 días (Figura 14A), 14 días (Figura 14C), 18 días (Figura 14E) o 21 días (Figura 14F) después de la inducción de la enfermedad. Las puntuaciones de enfermedad clínica se compararon con las de después del tratamiento con esplenocitos acoplados a antígeno (Figura 14A). El día 42, se extrajo el cerebro y la médula espinal de ratones tolerizados con PLP₁₃₉₋₁₅₁ o con OVA₃₂₃₋₃₃₉ para su análisis histológico. Secciones de ratones del panel A se tiñeron para la proteína PLP y CD45 (Figura 14B). Las secciones de la médula espinal de ratones del panel C se tiñeron con Luxol Fast Blue (Figura 14D). Las zonas de desmielinización e infiltración celular se indican con flechas. Los resultados muestran que las partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG inducen tolerancia en ratones con EAE adoptiva.

En la Figura 15 se muestran gráficos que representan las puntuaciones clínicas medias de ratones con EAE activa y EAE adoptiva después del tratamiento con partículas SP o PLG conjugadas con OVA₃₂₃₋₃₃₉ o PLP₁₃₉₋₁₅₁. Los ratones recibieron inyección iv de PLP₁₃₉₋₁₅₁-SP, PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG u OVA₃₂₃₋₃₃₉-SP u OVA₃₂₃₋₃₃₉-péptido PLG acoplado a nanopartículas 500 nm 10 días (Figura 15A) o 2 días (Figura 15B) después de la inducción de la enfermedad y se determinó la puntuación clínica media. En ambos casos, administración de partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLG reducen la enfermedad, lo que indica inducción de tolerancia.

La infiltración de células inmunitarias del sistema nervioso central también se reduce drásticamente en ratones tolerizados con PLP-PLG. Ratones SJL/J recibieron inyección i.v. de nanopartículas de PLG 500 nm acopladas a PLP₁₃₉₋₁₅₁ (cuadrados) o a OVA₃₂₃₋₃₃₉ (círculos) 2 días después de la inducción de EAE por transferencia adoptiva. En el pico de la enfermedad (día 14), se extrajeron los cerebros y las médulas espinales y, a través de citometría de flujo, se hizo un recuento de la cantidad de linfocitos (Figura 16B), CPA (Figura 16C), microglia (Figura 16D), células dendríticas periféricas (Figura 16E), células dendríticas mieloides (Figura 16F) y macrófagos (Figura 16G). En la figura 16A se muestra la estrategia de selección de estas poblaciones. Las preparaciones de células del SNC se estimularon con PMA e ionomicina durante 5 h antes de la tinción intracelular para IL-17A e IFN- γ (Figura 16H).

Ejemplo 10

El tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti PD-1 anula la inducción de la tolerancia con nanopartículas de PLG que encapsulan PLP₁₃₉₋₁₅₁ en EAE de transferencia adoptiva

Para analizar el efecto del tratamiento con un anticuerpo anti PD-1 sobre la tolerancia inducida por PLP₁₃₉₋₁₅₁ en ratones con EAE adoptiva, el día 0, los ratones recibieron por administración intravenosa 3x10⁶ blastocitos T activados con PLP₁₃₉₋₁₅₁. El día 2, recibieron PLP₁₃₉₋₁₅₁ u OVA₃₂₃₋₃₃₉ encapsulada en partículas de PLG mediante administración intravenosa con PBS o con un anticuerpo anti PD-1. Los días 4, 6, 8, 10 y 12 todos los animales recibieron 250 μ g de anticuerpo anti PD-1 o PBS.

Como se muestra en la Figura 17, la administración del péptido PLP₁₃₉₋₁₅₁ encapsulado en una partícula de PLG induce tolerancia cuando la partícula se administra con PBS. Sin embargo, la administración del anticuerpo anti PD-1 disminuye esta tolerancia.

Ejemplo 11

El tratamiento con un anticuerpo monoclonal agonista anti CD40 anula la inducción de tolerancia con nanopartículas de PLG que encapsulan PLP₁₃₉₋₁₅₁ en EAE de transferencia adoptiva de manera dependiente de IL-12

Para analizar el efecto del tratamiento con un anticuerpo agonista anti CD40 sobre la tolerancia inducida por PLP₁₃₉₋₁₅₁ en ratones con EAE adoptiva, el día 0, los ratones recibieron, por administración intravenosa, 3x10⁶ blastocitos T activados con PLP₁₃₉₋₁₅₁. El día 2, los ratones recibieron PLP₁₃₉₋₁₅₁ u OVA₃₂₃₋₃₃₉ encapsulada en partículas de PLG mediante administración intravenosa. El día 3, los animales recibieron un anticuerpo de IgG2a de control, un anticuerpo anti CD40, o un anticuerpo anti CD40 y un anticuerpo anti IL-12.

Como se muestra en la Figura 18, la administración del péptido PLP₁₃₉₋₁₅₁ encapsulado en una partícula de PLG induce tolerancia cuando la partícula se administra con PBS. La administración del anticuerpo agonista anti CD40 disminuye esta tolerancia, pero esta disminución de tolerancia se invierte mediante la adición de un anticuerpo anti IL-12.

Ejemplo 12

La OVA encapsulada en partículas de PLG inhibe profilácticamente la inflamación alérgica de las vías respiratorias y las respuestas de Th2 específicas de OVA in vivo

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

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

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

10 La OVA encapsulada en partículas de PLG inhibe profilácticamente respuestas de memoria *in vitro* específicas de OVA de los ganglios linfáticos mediastínicos. Como se muestra en la Figura 20A, la proliferación de ganglios linfáticos observada después de la reestimulación con OVA 25 µg disminuye en los animales tratados con OVA-PLG. Además, el tratamiento con OVA-PLG disminuye la liberación de citocinas después de la reestimulación con OVA. En la Figura 20B se muestra que los niveles de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 disminuyen en los ratones tratados con OVA-PLG.

Ejemplo 13

La OVA encapsulada en partículas de PLG inhibe terapéuticamente la inflamación alérgica de las vías respiratorias y las respuestas Th2 específicas de OVA in vivo

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

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

20 En la figura 22 se muestra que la OVA encapsulada en partículas de PLG regula negativa y terapéuticamente citocinas Th2 específicas de OVA en el líquido de LBA (lavado broncoalveolar) mejor de lo que lo hacen las partículas de PLG acopladas a OVA. Los animales se trataron como se describe anteriormente, excepto que los días 28 y 42, los ratones se trataron con OVA encapsulada en partículas de PLG o con OVA acoplada a partículas de PLG. De manera sorprendente, la OVA encapsulada inhibió la secreción de citocinas Th2 más de lo que lo hacía el péptido OVA acoplado a la superficie de la partícula de PLG.

Ejemplo 14

La tolerancia inducida por cromogranina A péptido p31-partículas de PLG, inhibe la diabetes de tipo 1

30 La diabetes tipo I se indujo en ratones BDC2.5 aislando células de bazo, de ganglios linfáticos axilares, braquiales e inguinales y pancreáticas de ratones a las 3 semanas. Las células aisladas se cultivaron y activaron *in vitro* incubando durante 96 horas 2×10^6 células/ml con péptido p31 0,5 µM. Mediante administración intravenosa, se transfirieron 5×10^6 células a ratones NOD.SCID (6-8 semanas) en el Tiempo 0. Los ratones se tolerizaron mediante administración intravenosa con péptido p31 o MOG₃₅₋₅₅ acoplado a SP o a PLG 2 horas a 3 días después.

35 En las Figuras 23A y 23B se muestran los niveles de glucosa en sangre en los animales después del tratamiento. La administración del péptido p31 acoplado a PLG produjo niveles de glucosa en sangre más bajos en comparación con los observados después de la administración de las partículas acopladas al péptido MOG₃₅₋₅₅. En la Figura 23C se muestra que el porcentaje de células secretoras de IFN γ observado en los animales, también se redujo en los ratones tratados con p31-PLG en comparación con el de los ratones tratados con el péptido MOG₃₅₋₅₅-PLG.

40 La tolerancia inducida por p31-PLG requiere Tregs. La diabetes de tipo 1 se indujo en ratones como se describió anteriormente, y 2 horas después de que las células activadas se transfirieran a los ratones NOD.SCID, los ratones se tolerizaron con partículas de p31-PLG o MOG₃₅₋₅₅-PLG. Como se muestra en la Figura 24, el empobrecimiento de Tregs anula la tolerancia inducida por la administración de partículas p31-PLG.

Ejemplo 15

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

45 Ratones NOD se trataron con partículas de PLG acopladas a BSA (N=22) o a insulina (N=23) mediante administración intravenosa a las 6, 8 y 10 semanas de vida. El desarrollo de la diabetes, que se definió como glucosa en sangre > 250 mg/dl, se investigó en los ratones. Como se muestra en la Figura 25, la administración de las partículas de PLG acopladas a insulina aumentó significativamente el porcentaje de ratones que no desarrollaron diabetes durante 300 días (69,6 % en comparación con 22,7 %; p=0,0027).

Ejemplo 16

Cinética de injertación

5 Ratones hembra CD45.2 se tolerizaron con OVA-PLG o con el péptido de control Dby-PLG (el antígeno H-Y principal expresado por ratones macho C57BL/6) el día -7. El día -1, los ratones se irradiaron con 200 rads y después recibieron un trasplante de 1×10^6 , 5×10^6 o 1×10^7 células de médula ósea de ratones CD45.1 macho el día 0. Después, los ratones receptores se tolerizaron con OVA-PLG, Dby-SP o Dby-PLG el día 1 y se recogió sangre para análisis de quimerismo mediante FACS. En la figura 26 se muestra el porcentaje de células donantes CD45.1 observado en los ratones receptores.

10 En la figura 27 se muestra el porcentaje de células CD45.1 donantes observado en los ratones receptores después de la tolerización con OVA-PLG, Dby-SP o Dby-PLG el día 1. Un ratón de control positivo no demostró injertación significativa (~10 %). Ninguno de los ratones tratados de control negativo demostró injertación de células donantes. Un ratón tratado con Dby-SP no demostró injertación significativa (~10 %). Dos ratones tratados con OVA-PLG demostraron injertación de células donantes (~10 %): en un caso el rechazo fue completo a la semana 16. Un ratón tratado con Dby-PLG comenzó a rechazar a la semana 12 y el rechazo fue del 10 % a la semana 16. A la semana 16 la injertación del grupo tratado con Dby-PLG varió entre 10 % y 56 %. Los ratones tratados con OVA-PLG demostraron: 1) injertación espontánea, 2) homología de secuencias entre OVA323 y Dby o 3) propiedades tolerogénicas de las partículas. Dby-PLG permite mayor injertación que Dby-SP y OVA-PLG.

15 En la figura 28 se muestra que el ritmo de tolerancia tiene un efecto en el porcentaje de células CD45.1 en el ratón receptor. Los controles positivos muestran menor injertación (~4 %) de la esperada (~10 %). Un ratón de control negativo tenía un 5 % de injertación. De los 3 grupos tratados con OVA-PLG, un ratón del grupo del día -7, día +1 mostró injertación (12%). Desde el punto de vista clínico, la tolerancia el día 1 es más relevante que la tolerancia el día -7.

Ejemplo 17

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

25 Los ratones se trataron con partículas de PLGA teñidas con cumarina 6 que se acoplaron a un antígeno o que carecían de antígeno. Como se muestra en la Figura 29, las partículas fueron detectables 3 horas después de la administración, pero no 24 horas después a la administración. Secciones de bazo (columna de la izquierda), hígado (columna central) y pulmón (columna de la derecha) de ratón no tratado previamente (fila superior), que no recibió inyección, en comparación las de ratón al que se inyectó por vía i.v. micropartículas de PLGA/PEMA fluorescentes, 3 horas (fila central) y 24 horas (fila inferior) después de la inyección, se tiñeron con tinción de contraste DAPI.

Ejemplo 18

30 *Las nanopartículas están asociadas a macrófagos in vivo*

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

35 Los macrófagos de la zona marginal absorben predominantemente partículas de PLP₁₃₉₋₁₅₁ acopladas marcadas con TAMRA 24 horas después de la infusión intravenosa. Como se muestra en la Figura 31, el porcentaje más alto de células PLP₁₃₉₋₁₅₁⁺ son macrófagos de la zona marginal.

Ejemplo 19

Inhibición de EAE-R en ratones SJL/J usando partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen PLP₁₃₉₋₁₅₁ soluble en sus núcleos.

40 Grupos de ratones SJL/J recibieron inyección IV de 2,5 mg de partículas de poli(láctido-co-glicólido) 500 nm-700 nm funcionalizadas en la superficie con péptido PLP₁₃₉₋₁₅₁ soluble en sus núcleos el día -7 y el día -1 antes de la sensibilización con PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA el día 0. Los ratones de control se sensibilizaron el día 0 pero no recibieron tratamiento con partículas ni el día -7 ni el día -1. Los signos clínicos de EAE-R de los ratones se observaron durante 20 días más.

45 Los resultados representados en la Figura 32 muestran la puntuación clínica media diaria frente al número de días de sensibilización con PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA. La EAE-R inducida por PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA se inhibe en ratones SJL/J a través de la inducción de tolerancia inmunológica utilizando partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen PLP₁₃₉₋₁₅₁ soluble en sus núcleos.

Ejemplo 20

50 *Inhibición de la inflamación alérgica de las vías respiratorias por partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen ovoalbúmina soluble*

Se indujo inflamación alérgica de las vías respiratorias (AIA, siglas del inglés *allergic airway inflammation*) en los ratones. Grupos de ratones Balb/c recibieron inyección intravenosa de 2,5 mg de partículas de poli(láctido-co-glicólido) 500 nm-700 nm funcionalizadas en la superficie con ovoalbúmina soluble o albúmina de suero bovino soluble (control)

en sus núcleos el día -7 y día +7 antes de sensibilizar con ovoalbúmina/alumbre los días 0 y +14. Los ratones se expusieron los días +28-30 a ovoalbúmina en aerosol. Después, los ratones se sacrificaron y se obtuvo líquido de lavado broncoalveolar. También se midieron los niveles séricos de IgE específica de ovoalbúmina.

5 Los recuentos de eosinófilos en el líquido de lavado broncoalveolar indican la gravedad de AAI - los recuentos más altos indican enfermedad más grave. Los niveles séricos de IgE indican la gravedad de AAI - los niveles más altos indican enfermedad más grave.

En la figura 33 se muestra que los ratones tratados con OVA encapsulada-PLG mostraron la mayor reducción en la acumulación de eosinófilos. En la figura 34 se muestra que los ratones tratados con OVA-PLG encapsulada mostraron la mayor reducción en los niveles de IgE en suero en comparación con los animales no tratados o tratados con control.

10 La inflamación alérgica de las vías respiratorias inducida por ovoalbúmina/alumbre en ratones Balb/c se inhibió por la inducción de tolerancia inmunológica usando partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contenían ovoalbúmina soluble en sus núcleos.

Ejemplo 21

Síntesis de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie con encapsulación antigénica

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

20 La alta densidad de grupos carboxilato se obtuvo usando poli(anhídrido maleico-*alt*-etileno (PEMA)), un polímero con grupos carboxilato incorporados en su cadena principal, como tensioactivo para el proceso de emulsificación.

25 Como se ha descrito anteriormente, las partículas biodegradables de poli(láctido-co-glicólido) que contienen PLP₁₃₉₋₁₅₁ soluble en sus núcleos y que están funcionalizadas en la superficie con una alta densidad de grupos carboxilato, son eficaces para la inducción de la tolerancia inmunológica en el modelo murino de esclerosis múltiple de EAE-R inducida por PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA en ratones SJL/J. Asimismo, las partículas biodegradables de poli(láctido-co-glicólido) que contienen ovoalbúmina soluble en sus núcleos y que están funcionalizadas en la superficie con una alta densidad de grupos carboxilato, son eficaces para la inducción de la tolerancia inmunológica en el modelo murino de asma alérgica de AAI inducida por ovoalbúmina/alumbre en ratones Balb/c.

30 Las partículas de poli(láctido-co-glicólido) que contienen ovoalbúmina soluble o albúmina de suero bovino en sus núcleos y que están funcionalizadas en la superficie con una alta densidad de grupos carboxilato, se sintetizaron de la siguiente manera usando un método de doble emulsión-evaporación del disolvente:

1. En un vial de centelleo de 20 ml, 150 µl de ovoalbúmina o albúmina de suero bovino 200 mg/ml en agua sin endotoxina se añadieron gota a gota a 2 ml de poli(láctido-co-glicólido) al 20 % p/v en diclorometano.

2. La mezcla resultante se colocó en hielo y se sometió a ultrasonidos durante 30 segundos a 10 vatios usando un ultrasonidos con sonda.

35 3. se añadieron 10 ml de poli(anhídrido maleico-*alt*-etileno) al 1 % p/v en agua.

4. La mezcla resultante se colocó en hielo y se sometió a ultrasonidos durante 30 segundos a 16 vatios usando un ultrasonidos con sonda.

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

40 6. Las partículas endurecidas se purificaron después por centrifugación y se lavaron 3 veces con tampón de bicarbonato a pH de 9,6.

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

45 En la figura 35 se muestra la caracterización de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen PLP₁₃₉₋₁₅₁ soluble en sus núcleos mediante análisis de dispersión dinámica de luz. Las partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie, se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) a una velocidad de recuento de $1,792 \times 10^5$ cuentas por segundo en agua a 18,2 Mw. La población de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie tenía un diámetro promedio Z de 584 nm, un diámetro pico de 679 nm y un índice de polidispersidad de 0,162. Estos resultados son representativos de 6 lotes de síntesis, siguiendo el protocolo escrito anteriormente.

50 En la figura 36 se muestra la caracterización de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie

que contienen PLP₁₃₉₋₁₅₁ soluble en sus núcleos mediante medición del potencial ζ . Las partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie, se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) a una velocidad de recuento de $6,67 \times 10^4$ cuentas por segundo en agua a 18,2 Mw. La población de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie tenía un potencial ζ pico de -48,9 mV y una desviación ζ de 5,14 mV. Estos resultados son representativos de 6 lotes de síntesis, siguiendo el protocolo escrito anteriormente.

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

En la figura 38 se muestra la caracterización de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen ovoalbúmina soluble en sus núcleos mediante medición del potencial ζ . Las partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie, se analizaron en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) a una velocidad de recuento de $2,67 \times 10^4$ cuentas por segundo en agua a 18,2 Mw. La población de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie tenía un potencial ζ pico de -52,2 mV y una desviación ζ de 5,38 mV. Estos resultados son representativos de 3 lotes de síntesis, siguiendo el protocolo escrito anteriormente.

Ejemplo 22

Los liposomas funcionalizados en la superficie que contienen PLP₁₃₉₋₁₅₁ soluble en sus núcleos inducen tolerancia inmunológica en el modelo murino de EAE-R de esclerosis múltiple

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

Los liposomas utilizados en este estudio estaban compuestos por los siguientes lípidos: fosfatidilcolina: fosfatidilglicerol:colesterol a las siguientes relaciones molares: 30:30:40. Grupos de ratones SJL/J recibieron inyección IV de liposomas 200 nm funcionalizados en la superficie (10 μ mol de lípido total por ratón) con péptido PLP₁₃₉₋₁₅₁ soluble en sus núcleos el día -7 con respecto a la sensibilización con PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA el día 0. Los ratones de control se sensibilizaron el día 0 y recibieron liposomas 500 nm - 700 nm funcionalizados en la superficie (10 μ mol de lípidos totales por ratón) con péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ soluble en sus núcleos el día -7. Los signos clínicos de EAE-R de los ratones se observaron durante 17 días más.

Los resultados representan la puntuación clínica media diaria frente al número de días de sensibilización con PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA. Como se muestra en la Figura 39, los animales tratados con liposomas funcionalizados en superficie con péptido PLP₁₃₉₋₁₅₁ soluble en sus núcleos tenían una puntuación clínica más baja que los animales tratados con los liposomas funcionalizados en la superficie que contenían el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ soluble.

Los resultados de este estudio demuestran que los liposomas biodegradables que contienen PLP₁₃₉₋₁₅₁ soluble en sus núcleos y que están funcionalizados en la superficie con una alta densidad de grupos con carga negativa, son eficaces para la inducción de la tolerancia inmunológica en el modelo murino de esclerosis múltiple de EAE-R inducido por PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA en ratones SJL/J.

La tolerancia inducida por partículas acopladas a antígeno o encapsuladas a antígeno es específica de antígeno, dependiente de la dosis y de larga duración (>150 días). La tolerancia se induce mejor mediante la administración intravenosa de una partícula acoplada que tiene entre 500 nm y 1 μ m de diámetro con un potencial zeta ≤ -5 mV. La inducción de tolerancia depende de la absorción de las partículas por el receptor captador MARCO con superficies polianiónicas (p. ej., partículas PS/PLG carboxiladas). La tolerancia se induce y conserva por una combinación de anergia (parcialmente invertida por anticuerpos anti PD-1 y agonistas anti CD40) e iTregs (parcialmente invertida por anticuerpos anti CD25). Las partículas se acumulan predominantemente en el hígado y los macrófagos (CD11b^{hi} CD11c^{lo} MARCO⁺ Sign-R1⁺ Siglec1⁻) en la zona marginal esplénica.

Existen numerosas ventajas de usar partículas acopladas a antígeno para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias en comparación con el uso de células dendríticas tolerogénicas inmaduras pulsadas o dirigidas por antígeno o Tregs específicas de antígeno modificadas por ingeniería genética. La rapidez y sencillez de la preparación de tolerógenos y la inducción usando un transportador tolerogénico universal listo para su uso, fabricable según las *Good Manufacturing Practice* (prácticas correctas de fabricación); no es preciso aislar y expandir células dendríticas inmaduras o Tregs ex vivo; no es preciso preocuparse de que las células dendríticas inmaduras se activen después de la manipulación ex vivo y se vuelvan estimuladoras en lugar de tolerogénicas o que las Tregs se transformen en Th1/17 después de la transferencia; dado que las CPA de la zona marginal inmadura procesan y representan el antígeno de manera tolerogénica, las CPA hospedadoras pueden seleccionar los autoepitopos inmunodominantes

relevantes de partículas de PLG que encapsulan autoantígenos intactos o extractos de tejido (p. ej., partículas de PLG encapsuladas con OVA impiden la AAD inducida por OVA/Alumbre); y el protocolo es específico de antígeno sin supresión espectadora, es seguro, muy eficaz y puede inducir falta de respuesta en células T efectoras (Th1, Th2, Th17 y CD8) y en células T vírgenes implicadas en la propagación epítópica.

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

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

15 Además, hemos diseñado estas partículas para que contengan ovoalbúmina soluble en sus núcleos para impedir la contaminación química y los problemas de pureza concernientes a la conjugación de péptidos o proteínas en la superficie. Estas partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie, que contienen ovoalbúmina soluble en sus núcleos, son eficaces para la prevención del desarrollo de la enfermedad y, por tanto, para la inducción de la tolerancia inmunológica en el modelo murino de asma alérgica de AAI inducida por ovalbúmina/alumbre en ratones Ba1b/c. Las proteínas o péptidos conjugados con partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas con carboxilato que usan EDC se conectan de una manera indiscriminada, dando como resultado agregados de antígeno y agregados de partícula-antígeno-partícula que son difíciles de caracterizar y purificar en poblaciones homogéneas.

20 Hemos producido una población homogénea de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie que contienen ovoalbúmina soluble en sus núcleos que no requieren la conjugación superficial del antígeno.

Además, hemos demostrado que los liposomas biodegradables que contienen PLP₁₃₉₋₁₅₁ soluble en sus núcleos y que están funcionalizados en su superficie con alta densidad de grupos con carga negativa, son eficaces para la inducción de la tolerancia inmunológica en el modelo murino de esclerosis múltiple de EAE-R inducido por PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA en ratones SJL/J.

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

1) Las partículas biodegradables no persistirán durante mucho tiempo en el organismo, y se puede controlar el tiempo de degradación completa.

30 2) Las partículas y los liposomas pueden funcionalizarse para facilitar la internalización sin activación celular. Hacia este objetivo, hemos cargado fosfatidilserina en microsferas de PLG.

3) También pueden diseñarse partículas y liposomas para incorporar ligandos de direccionamiento para una población celular específica.

35 4) También pueden incluirse citocinas antiinflamatorias tales como IL-10 y TGF- β , para limitar la activación del tipo de célula que está internalizando las partículas y para facilitar la inducción de tolerancia mediante anergia y/o delección y la activación de células T reguladoras.

Esta función combinatoria de la partícula o liposoma puede dirigir la inducción de tolerancia desde múltiples perspectivas, por tanto las partículas de diseño son un avance significativo en relación con las partículas de poliestireno. Entre las posibles aplicaciones clínicas de esta tecnología inductora de tolerancia se incluyen:

40 (1) enfermedades autoinmunitarias mediadas por células T y anticuerpos (tales como esclerosis múltiple, diabetes de tipo 1, artritis reumatoide, lupus sistémico, etc.) - se induciría tolerancia con partículas complejas con los autoantígenos relevantes que estimulan la enfermedad autoinmunitaria particular

45 (2) alergias alimentarias y pulmonares, alergias cutáneas y asma - la tolerancia se induciría con partículas complejas con los alimentos específicos (p. ej., proteínas de cacahuete, etc.), sustancias inyectadas (proteínas de veneno de abeja, etc.) o sustancias inhaladas (p. ej., proteínas de polen de ambrosía, proteínas de caspa de mascotas, etc.) que suscitan la reacción alérgica

(3) rechazo del trasplante - se induciría tolerancia a los antígenos del trasplante en los órganos o células del donante antes del trasplante de órganos para evitar el rechazo por parte del receptor

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

Ejemplo 23

Las partículas más eficaces al inducir tolerancia tienen carga negativa y un diámetro promedio de 500 nm

5 Los parámetros clave de las partículas para inducir la tolerancia son el tamaño y la carga de la composición. Como se muestra en la Figura 40A y B, la carga de la partícula afecta a la eficacia de la inducción de tolerancia. Una comparación de ratones con EAE tratados con partículas conjugadas con OVA con una carga de -25 mv o -60 mv encontró que las composiciones que comprenden partículas con una carga de -60 mv inducen tolerancia de manera más eficaz que las que tienen una carga de -25 mv. Los ratones se trataron con TIMP (partículas inmunomodificadoras tolerogénicas) que tenían una carga de -60 mv o -25 mv. Los ratones se trataron con OVA₃₂₃₋₃₃₉-TIMP_{-60 mv}, OVA₃₂₃₋₃₃₉-PLGA-25 mv, PLP₁₃₉₋₁₅₁-TIMP_{-60 mv} o PLP₁₃₉₋₁₅₁-PLGA-25 mv (todos los antígenos están encapsulados) y su enfermedad clínica se puntuó. En el panel (A) se muestra la puntuación clínica media y en el panel (B) se muestra la puntuación acumulada media de los animales con EAE.

10 La carga negativa en la partícula afecta a la capacidad de la partícula para interactuar con el receptor captador MARCO. En la Figura 41 se muestra que la carga de la partícula inmunomodificadora es importante para dirigir la partícula inmunomodificadora a la célula presentadora de antígeno. Los animales de tipo silvestre o MARCO -/+ se trataron con PS-IMP o con vehículo. Los resultados indican que las partículas con una carga negativa reducida tienen una eficacia inferior porque hay menos interacción con los receptores captadores tales como MARCO que tienen dominios similares al colágeno con carga positiva.

20 Además de la carga, el tamaño y la composición de las TIMP biodegradables influyen en la inducción de tolerancia. Como se muestra en la Figura 42A, las partículas más eficaces para inducir tolerancia en el modelo de EAE son las que tienen un diámetro medio de aproximadamente 500 nm. Los ratones se trataron con OVA₃₂₃₋₃₃₉-PSB 500 nm, PLP₁₃₉₋₁₅₁-PSB 100 nm, PLP₁₃₉₋₁₅₁-PSB 500 nm, PLP₁₃₉₋₁₅₁-PSB 1,75 µm o PLP₁₃₉₋₁₅₁-PSB 4,5 µm y su enfermedad clínica se puntuó. Los transportadores de PLGA tienen una cinética de liberación lenta durante más de 1 mes y el cambio de la relación del polímero puede impactar sobre a la liberación de las partículas. La tolerancia requiere rápida absorción y eliminación/degradación de las partículas. Dado que las proporciones de láctido:glucólido superiores a 50:50 reducen la velocidad de degradación, las partículas de la invención en una realización son 50:50 de láctido:glucólido. En la figura 42B se muestra que las partículas se destruyen rápidamente.

25 Además de la carga y el diámetro medio promedio de las TIMP, los antígenos que están encapsulados en la partícula son superiores a las partículas acopladas al antígeno en el modelo de alergia. En el modelo de alergia, las nanopartículas acopladas tienen tendencia a causar anafilaxia y no son una terapia eficaz. A la inversa, como se muestra en la Figura 43, las TIMP con una carga de -60 mv son terapéuticamente eficaces en el modelo de alergia murina. Los animales se expusieron a OVA como un alérgeno, y después se trataron con una partícula de PLG simulado o TIM, una partícula de PLG o TIMP con OVA, o no se trataron. En el panel (A) se muestra que las partículas de PLG-OVA no reducen la respuesta de TH2 en la alergia. En el panel (B) se muestra que TIMP_{PEMA-60 mv} inhibe esta respuesta de TH2. En el panel (C) se muestra que TIMP_{PEMA-60 mv} inhibe respuestas de recuerdo.

Ejemplo 24

35 *Síntesis de emulsión sencilla de partículas de poli(láctido-co-glicólido) funcionalizadas en la superficie con antígeno de encapsulación*

Los antígenos de polipéptidos pueden incorporarse en partículas de poli(láctido-co-glicólido) usando un proceso de doble emulsión (véase el Ejemplo 21), sin embargo, los presentes inventores han descubierto que al incorporar polipéptidos más hidrófobos, tal como gliadina, es mejor incorporar el antígeno en la partícula con un proceso de emulsión sencilla usando disolventes.

40 Se usó poli(láctido-co-glicólido) con grupos terminales carboxilato, a una relación de D,L-láctido:glucólido de 50:50 y una viscosidad intrínseca de 0,18 dl/g en hexafluoro-2-propanol para crear partículas que contengan gliadina. Las partículas de poli(láctido-co-glicólido) que contienen gliadina en sus núcleos y que están funcionalizadas en la superficie con una alta densidad de grupos carboxilato, se sintetizaron de la siguiente manera usando un método sencillo de evaporación de emulsión con disolvente:

- 45 1. Cinco miligramos de gliadina y 200 mg de PLG se disolvieron en 50 µl de ácido trifluoroacético (TFA) y 700 µl de dimetilsulfóxido y 1 250 µl de diclorometano (DCM).
2. La mezcla resultante se añadió gota a gota a 4 ml de PEMA acuoso al 1 % p/v y se sometió a ultrasonidos durante 30 segundos a una amplitud de 100 %.
- 50 3. La emulsión resultante se vertió en 200 ml de PEMA acuoso al 0,5 % p/v con agitación durante 12 horas para permitir que el DCM se evapore por completo.
4. Las partículas se lavaron después tres veces en tampón de carbonato de sodio-bicarbonato de sodio 0,1 M pH 9,6. Como alternativa, se puede usar ddH₂O para lavar las partículas.
5. Las partículas purificadas se resuspendieron en sacarosa al 4 % p/v y D-manitol al 3 % p/v en agua, se congelaron gradualmente a -80 °C y se liofilizaron hasta la sequedad.

55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende partículas biodegradables funcionalizadas en la superficie, que comprende gliadina encapsulada o uno o más epítomos antigénicos de gliadina, en donde la partícula tiene un potencial zeta negativo y en donde dicha partícula tiene un diámetro de entre 0,1 µm y 10 µm, en donde las partículas tienen un potencial zeta de -100 mV a -40 mV.
2. Una composición que comprende partículas biodegradables funcionalizadas en la superficie, que comprende gliadina encapsulada o uno o más epítomos antigénicos de gliadina, en donde la partícula tiene un potencial zeta negativo y en donde dichas partículas tienen un diámetro de entre 400 y 800 nanómetros y tienen un potencial zeta de entre -25 mV y -70 mV.
- 10 3. Una composición que comprende partículas biodegradables funcionalizadas en la superficie, que comprende gliadina encapsulada o uno o más epítomos antigénicos de gliadina, en donde la partícula tiene un potencial zeta negativo y en donde dichas partículas tienen un tamaño promedio posterior a la síntesis de 600 - 1500 nm y una carga promedio posterior a la síntesis de entre -30 mV y -80 mV.
- 15 4. La composición de las reivindicaciones 1-3, en donde la gliadina o uno o más epítomos antigénicos de gliadina comprenden una o más de las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 1295-1724, 1726-1766, 4983-4985 y 4986-5140.
5. La composición de las reivindicaciones 1-3, en donde las partículas comprenden poli(láctido-co-glicólido) (PLG), opcionalmente en donde las partículas comprenden PLG con una relación de copolímero de ácido poliláctico:ácido poliglicólico de 50:50.
- 20 6. La composición de las reivindicaciones 1-3, en donde la funcionalización en la superficie es carboxilación, opcionalmente en donde la carboxilación se realiza usando poli(anhídrido maleico-etileno) (PEMA).
7. La composición de las reivindicaciones 1-3, en donde las partículas tienen un tamaño promedio posterior a la síntesis de 600 nm y una carga promedio posterior a la síntesis de -50 mV.
8. La composición de las reivindicaciones 1-3, que comprende además excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 25 9. La composición de las reivindicaciones 1-3, para su uso en el tratamiento de la celiaquía en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar una composición farmacéutica que comprende las partículas funcionalizadas en la superficie de las reivindicaciones 1-3.

Figura 1

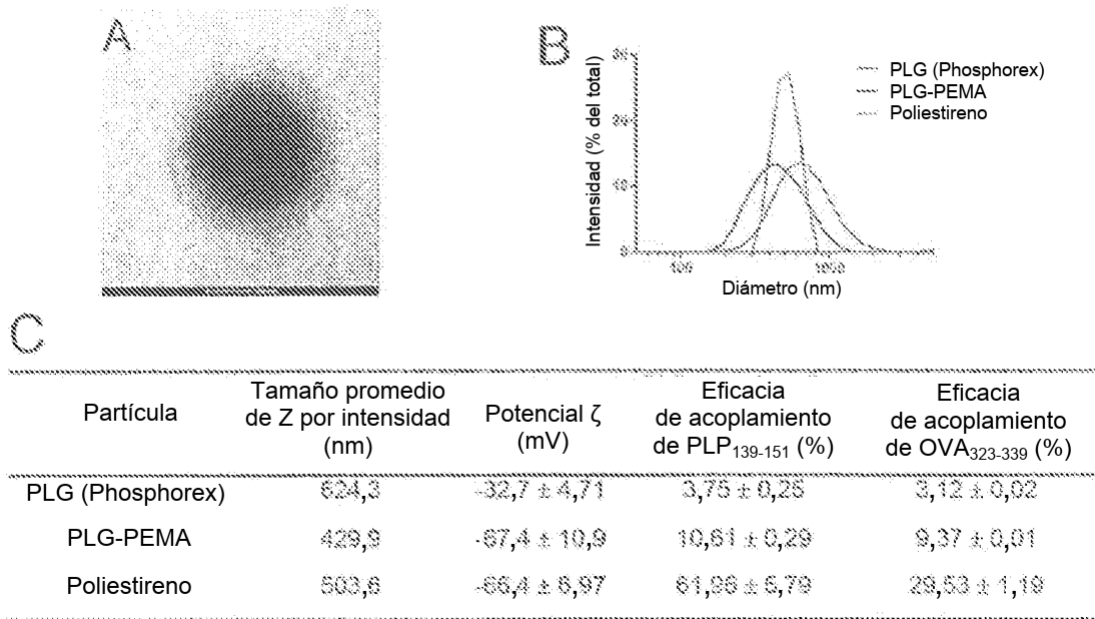


Figura 2

Día 7 Tolerancia, PLP₁₇₈₋₁₉₁/CFA enfermedad activa

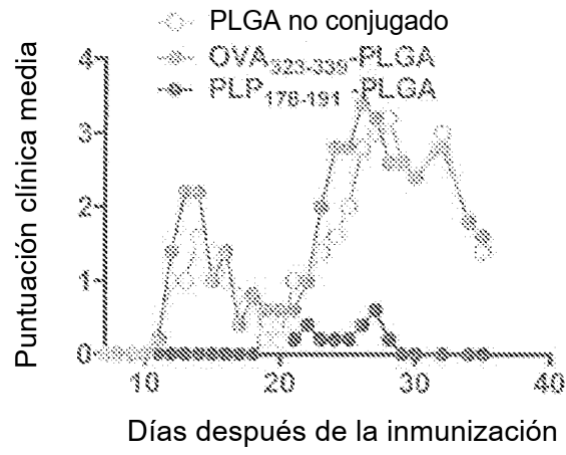


Figura 3A

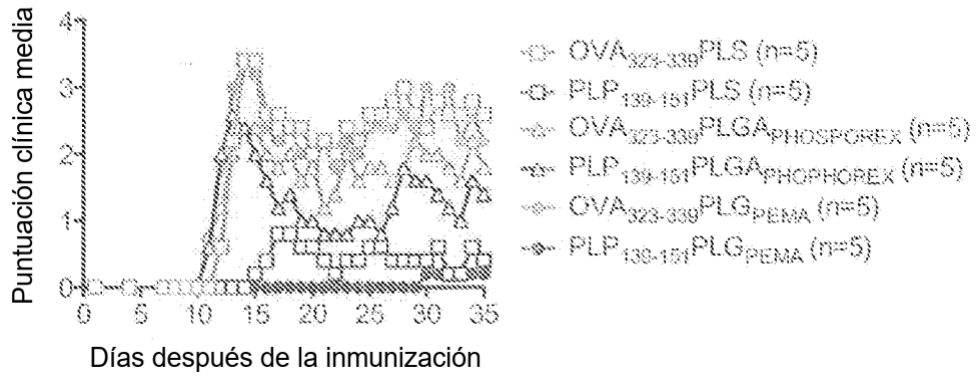


Figura 3B

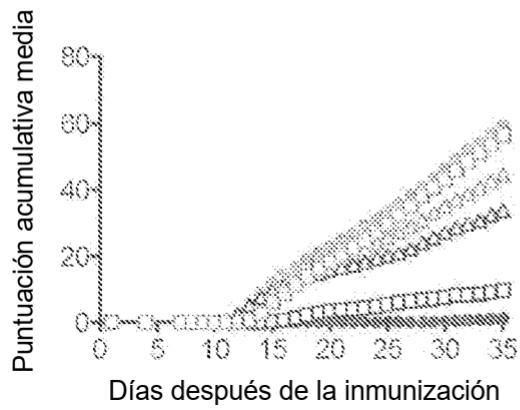
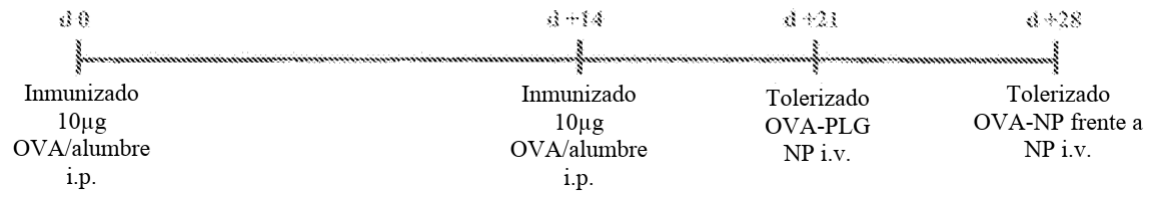


Figura 4



Cambio de temperatura en la segunda dosis de PLG

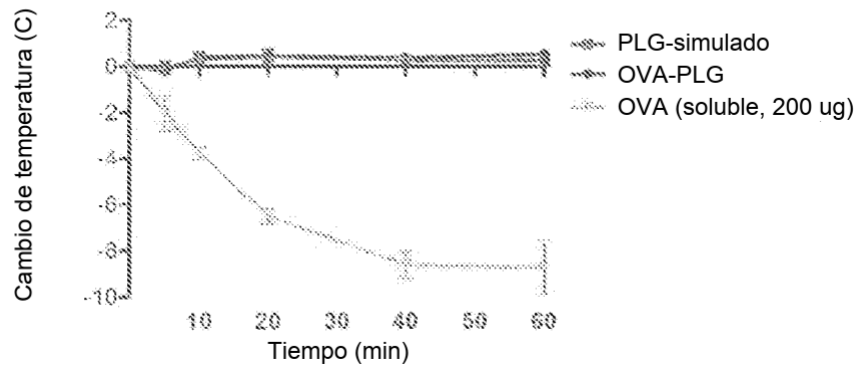
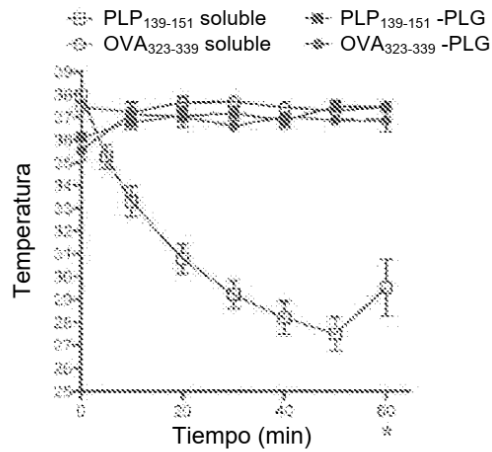


Figura 5

A. Cambio de la temperatura corporal después del tratamiento



** De los 6 ratones del grupo tratado con PLP139 soluble, 3 murieron antes de los 60 minutos. La temperatura de los 3 ratones restantes comenzó a aumentar después de 50 minutos y pudieron reestabilizarse.

B. Tolerizado día +21 PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA enfermedad activa

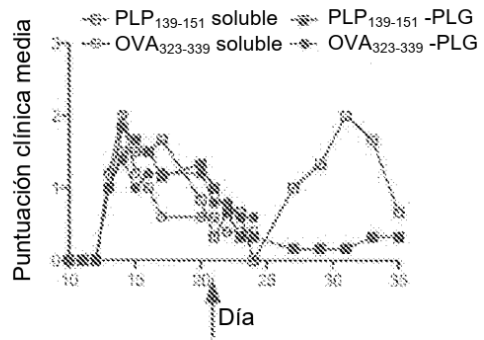


Figura 6

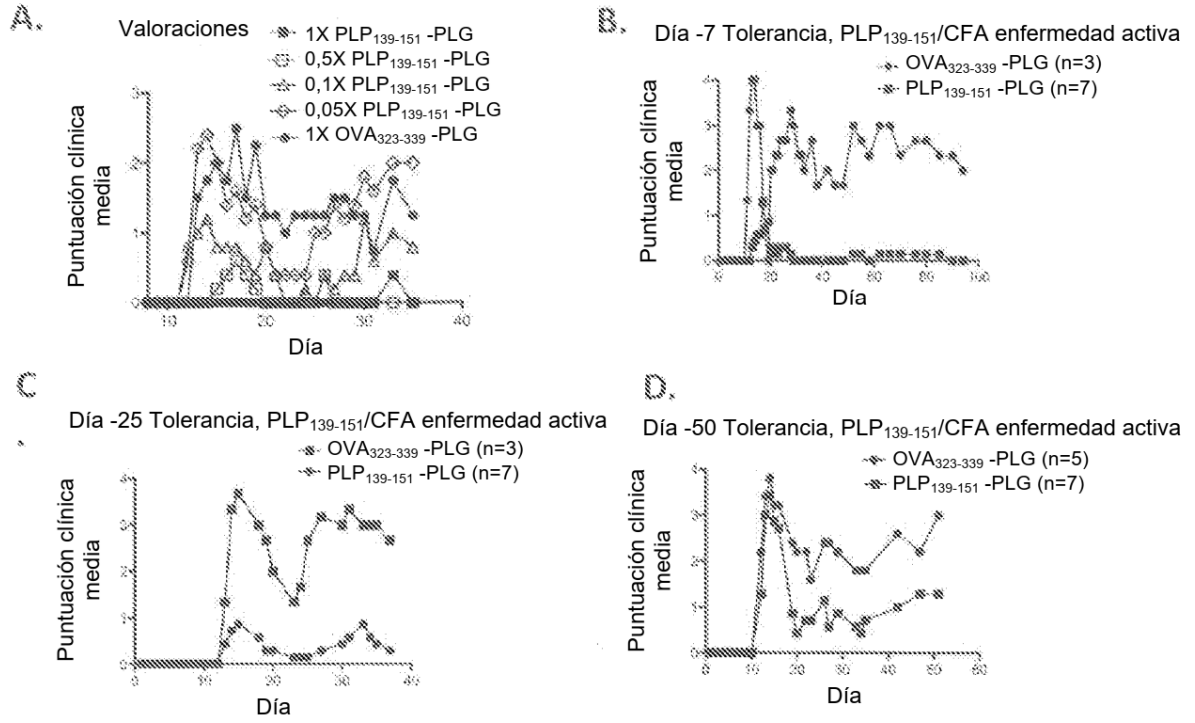


Figura 6

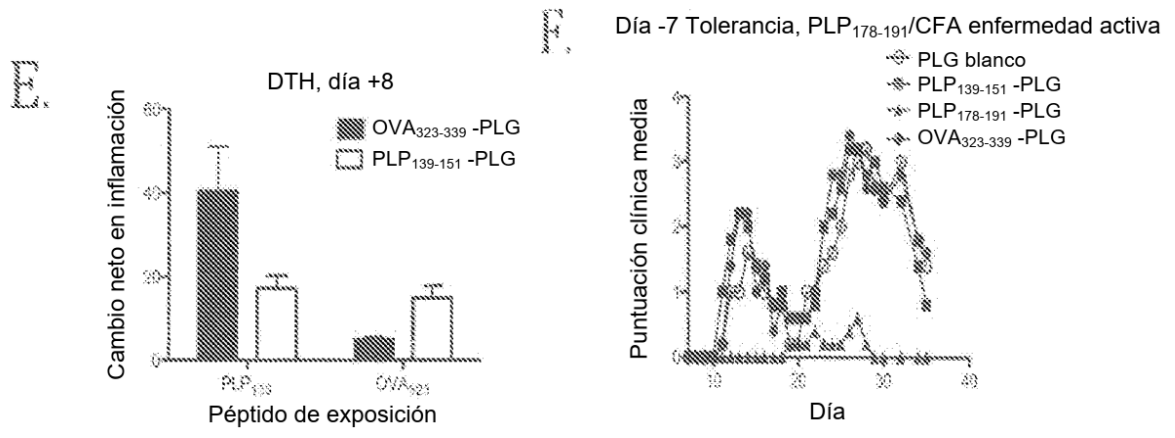


Figura 7

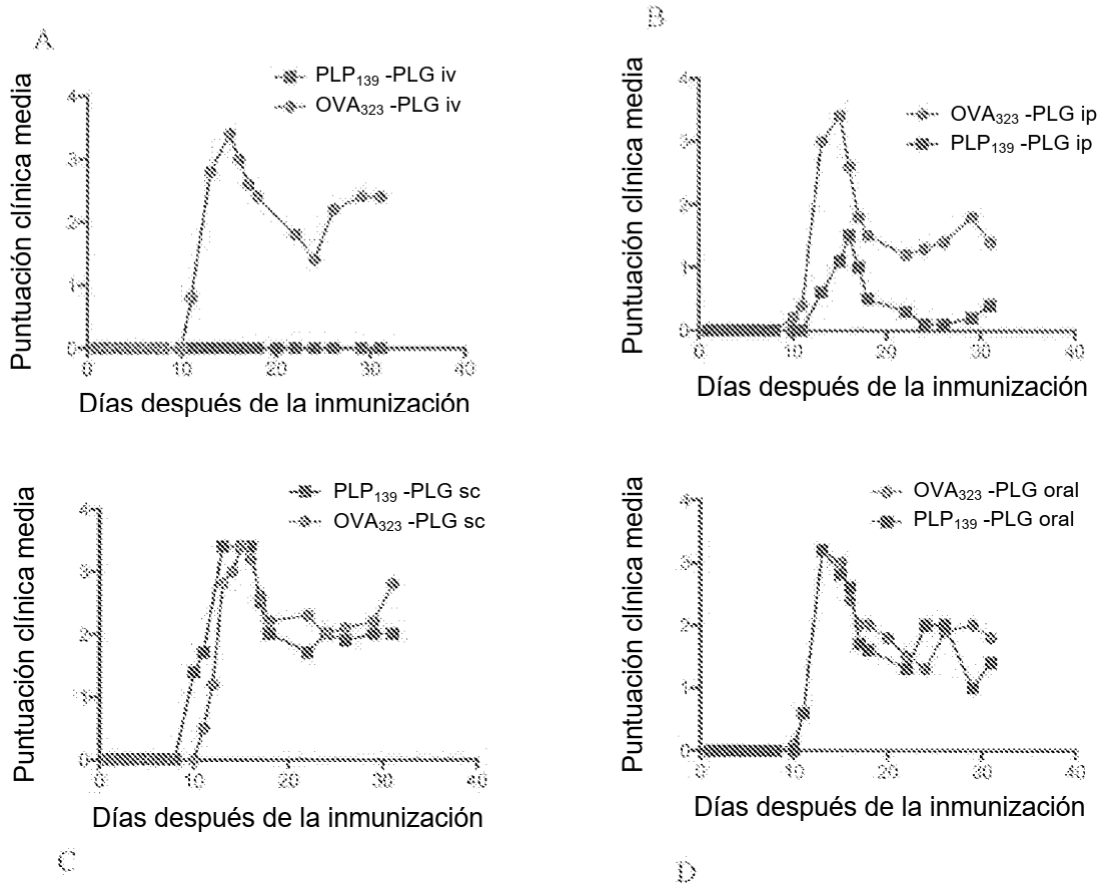


Figura 8

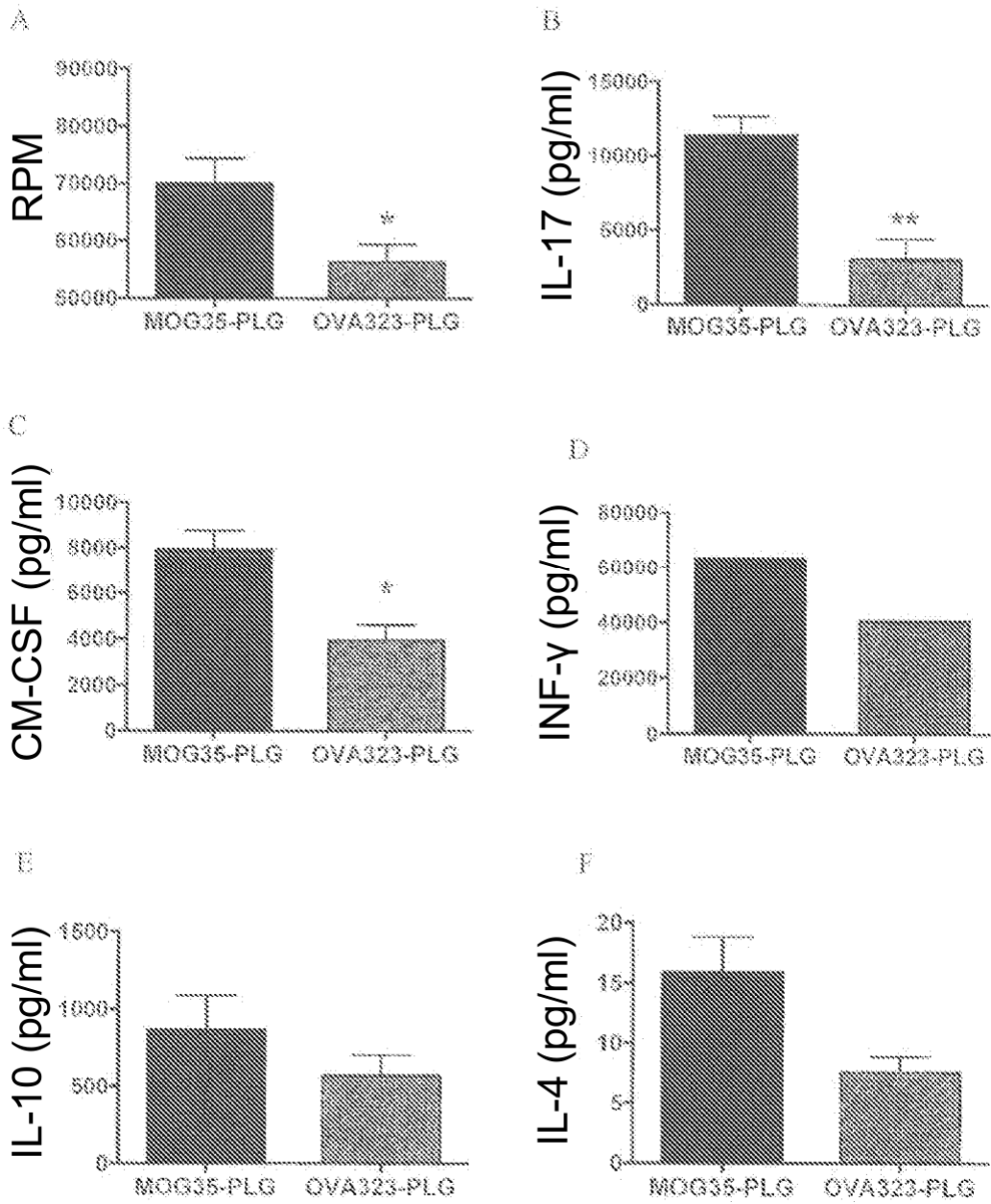


Figura 9

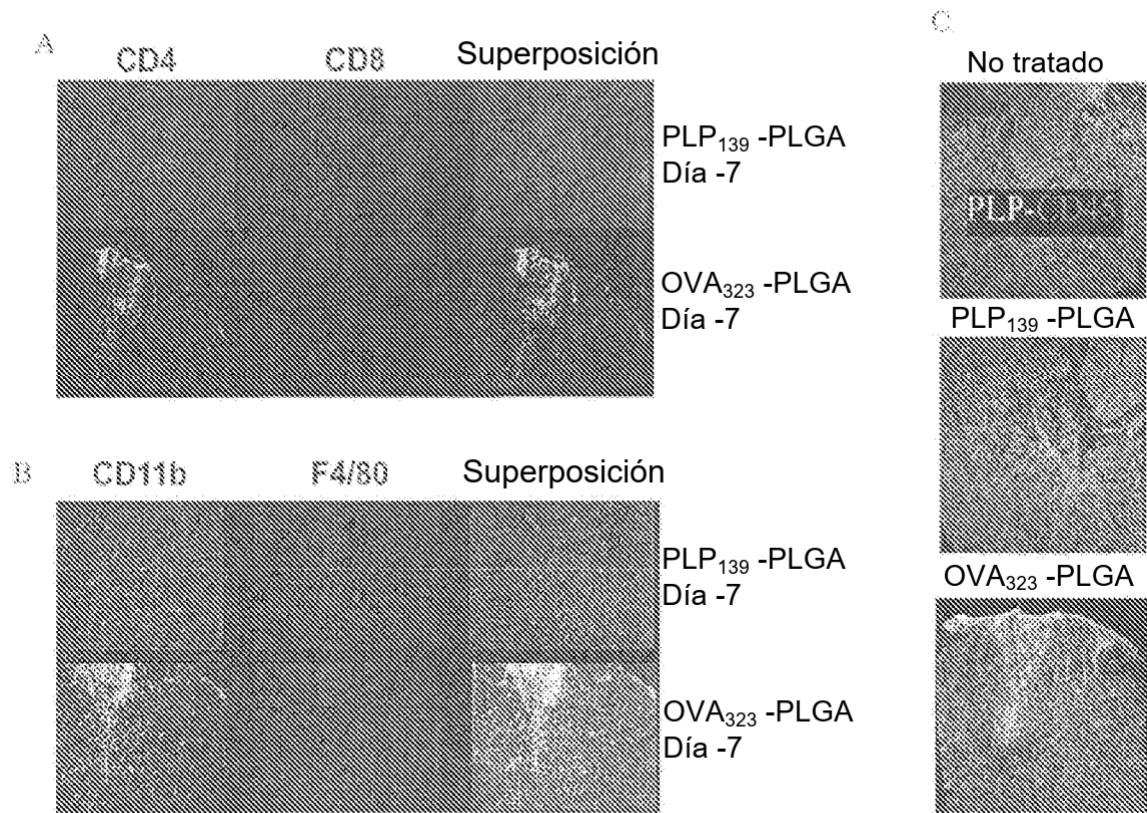


Figura 10

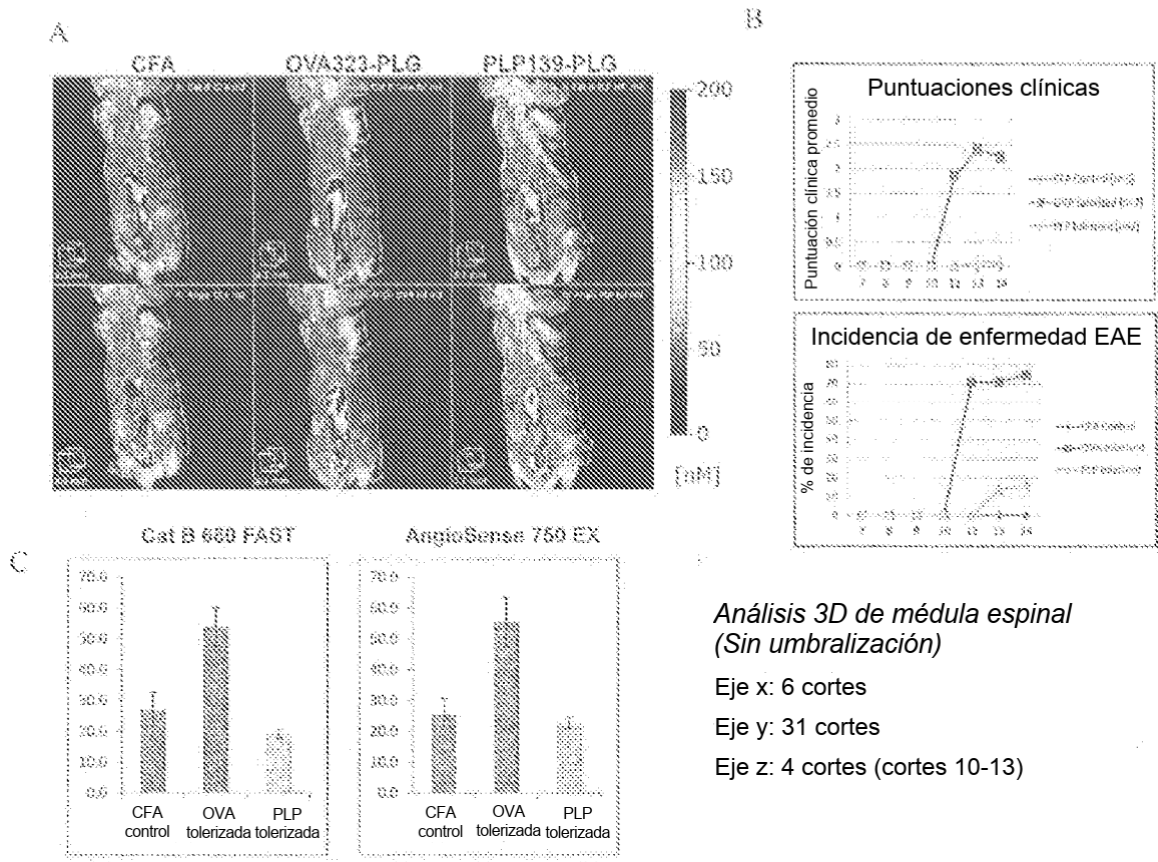
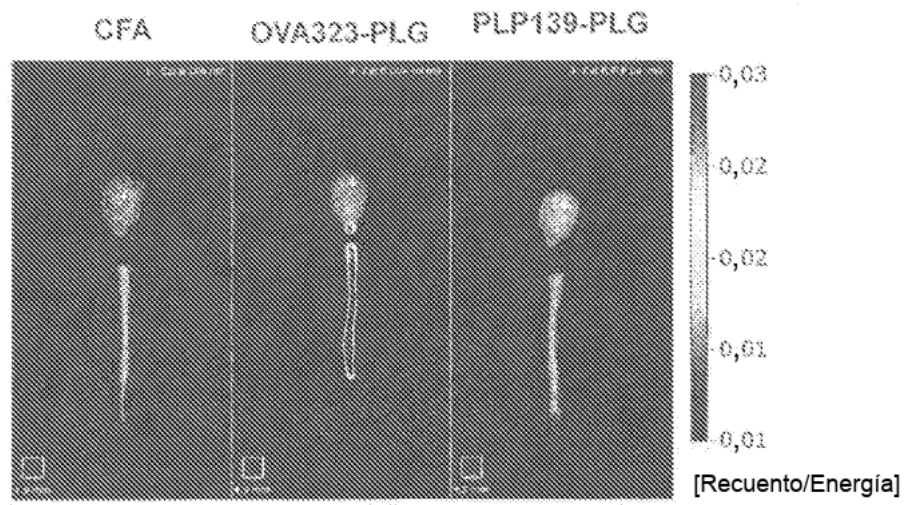


Figura 11A



B

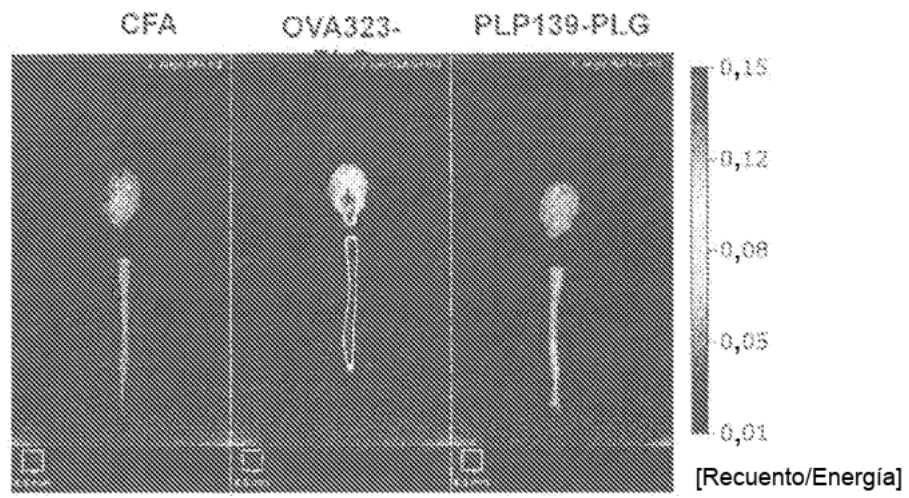


Figura 11

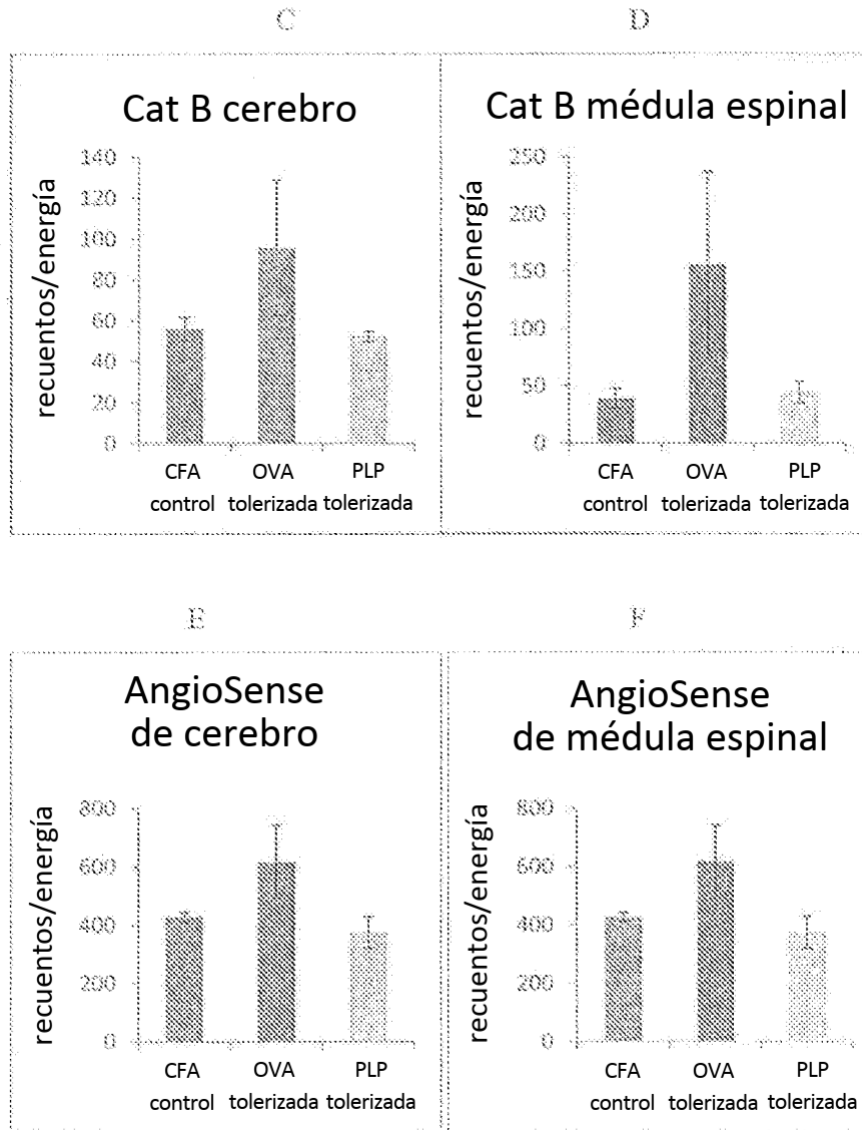


Figura 12

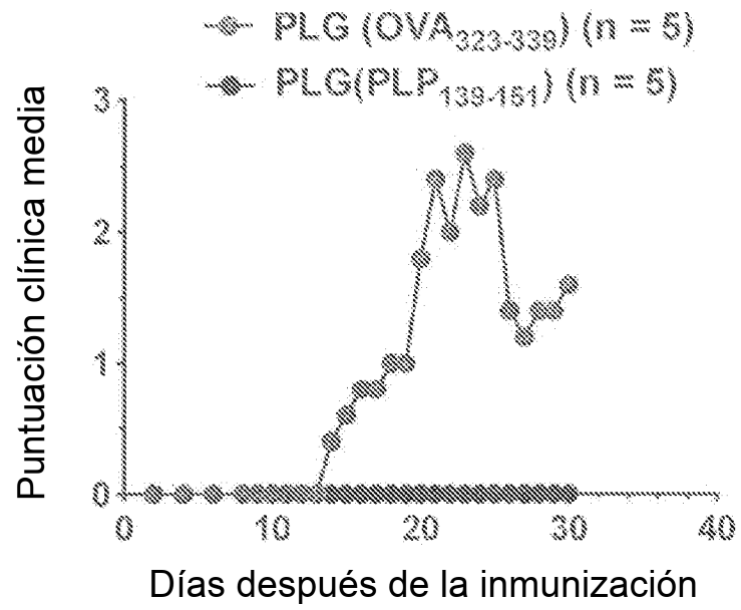


Figura 13

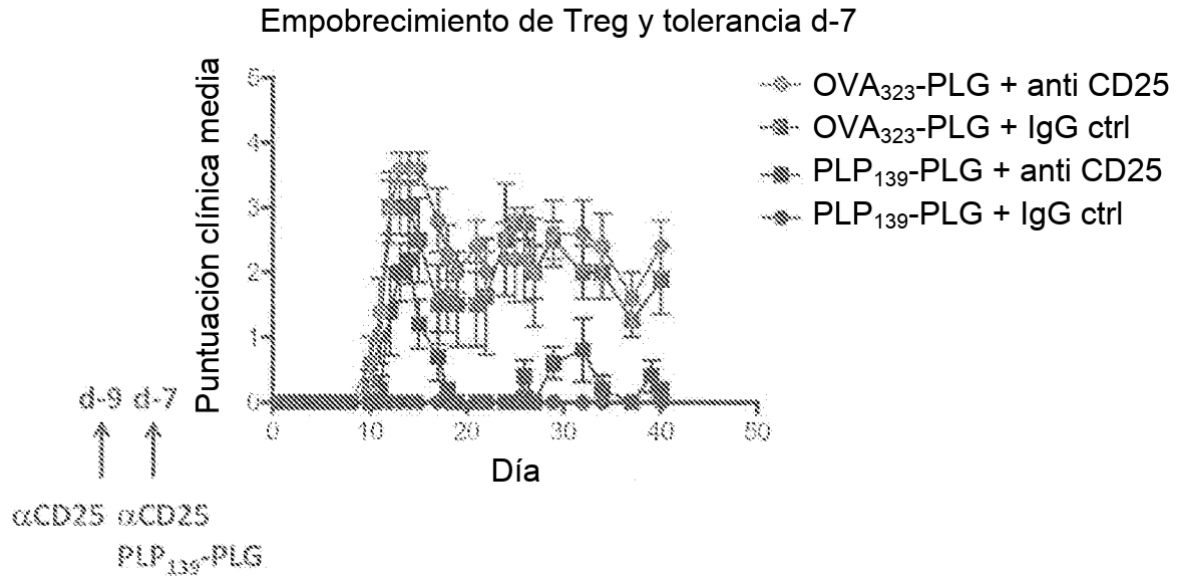


Figura 14

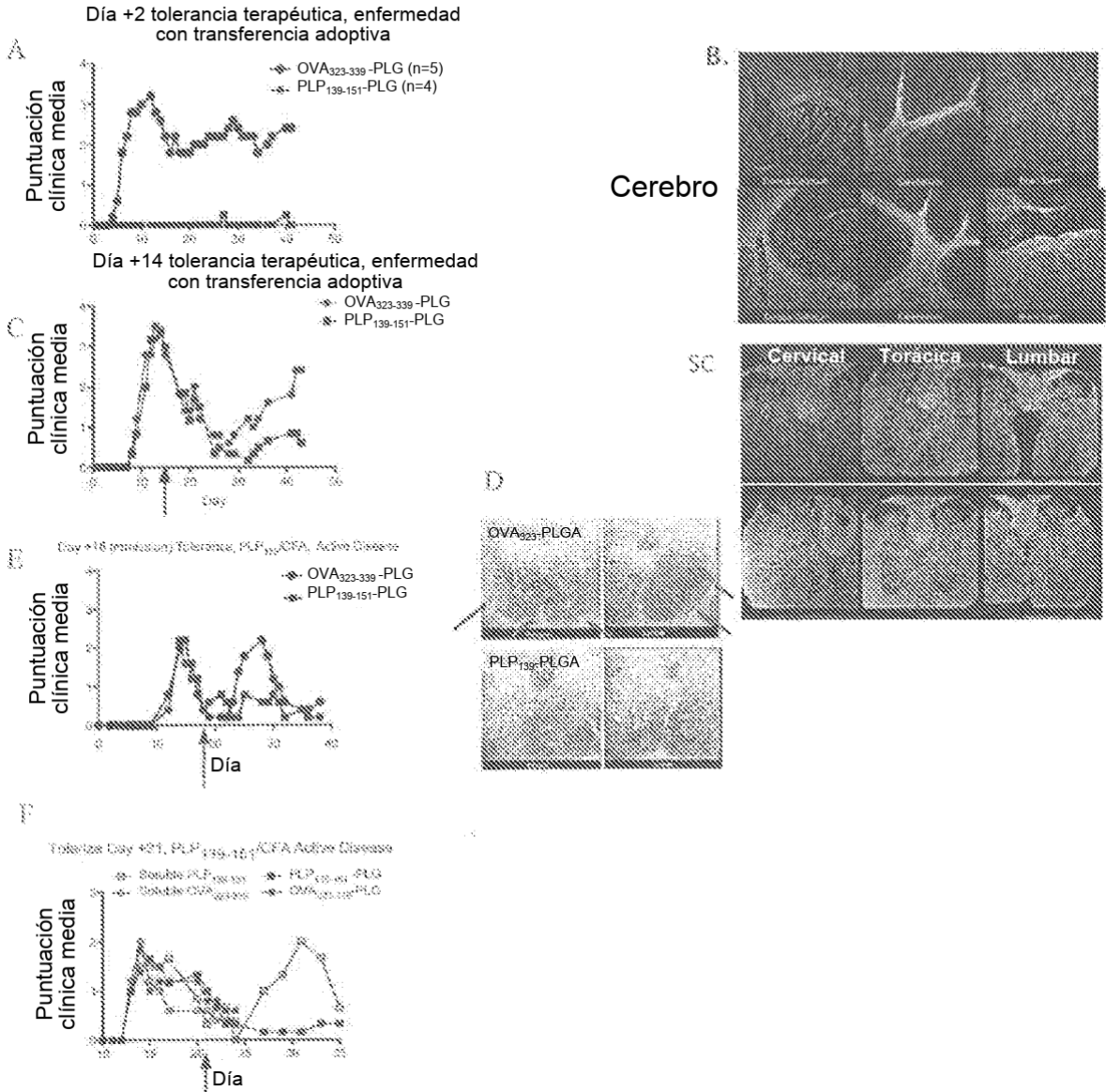


Figura 15

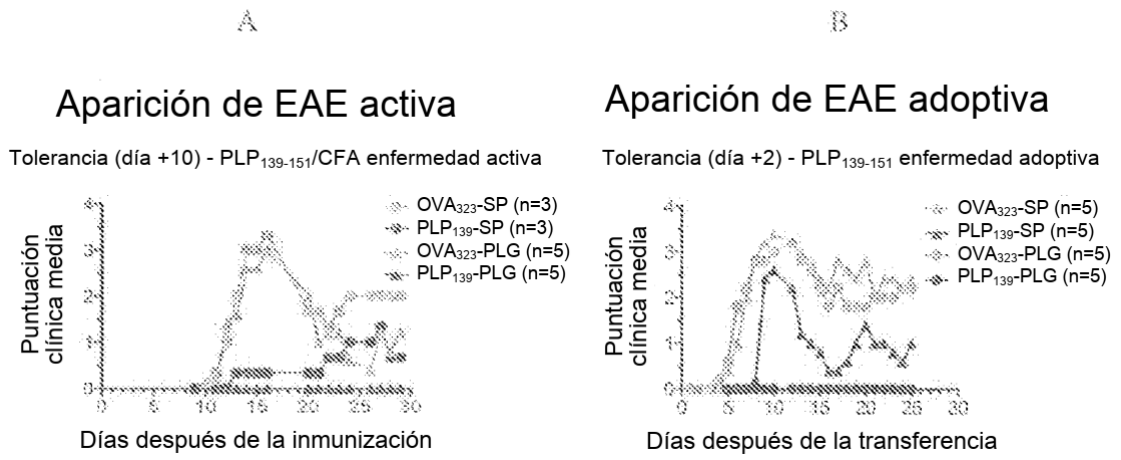


Figura 16

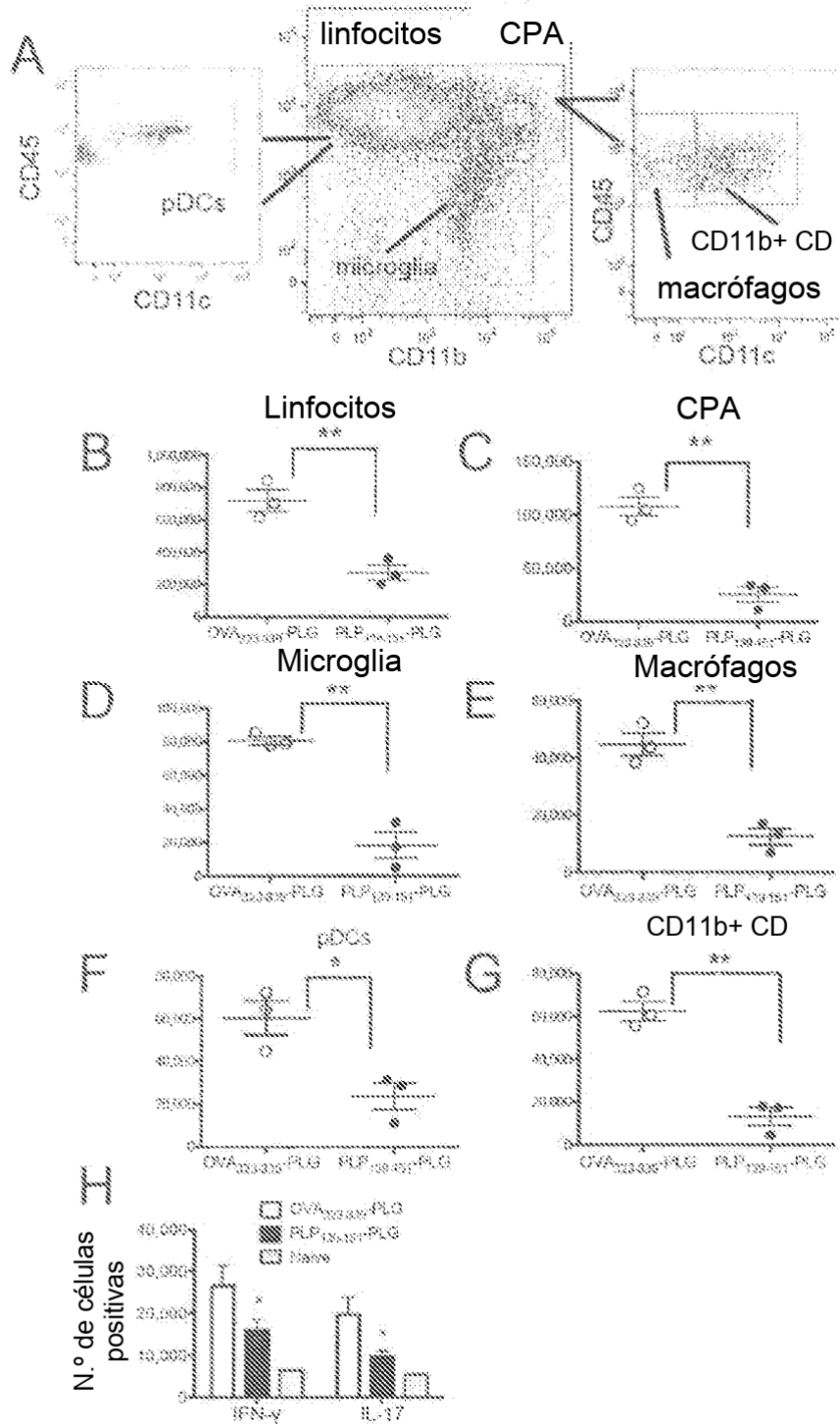
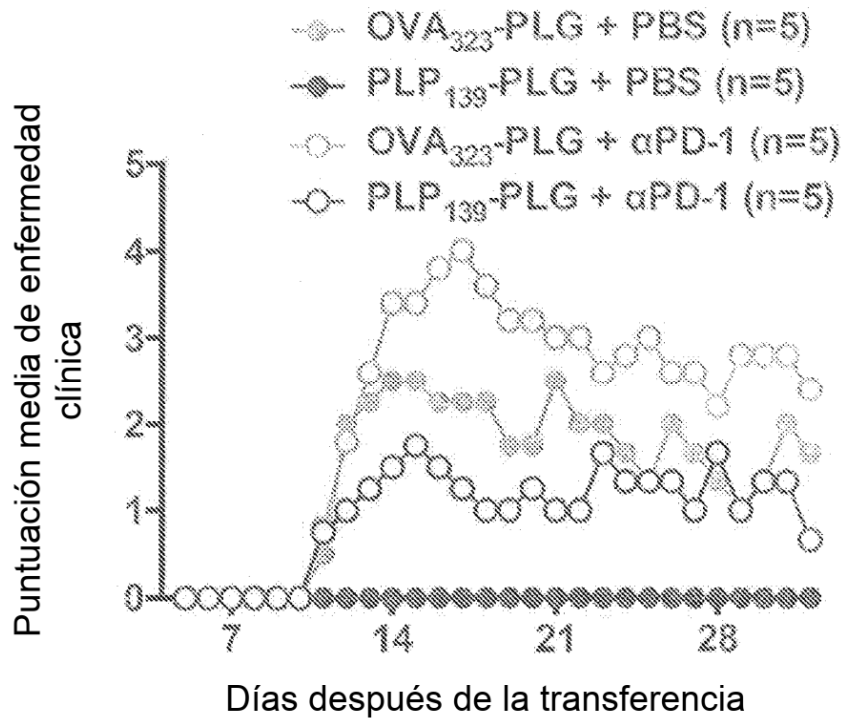
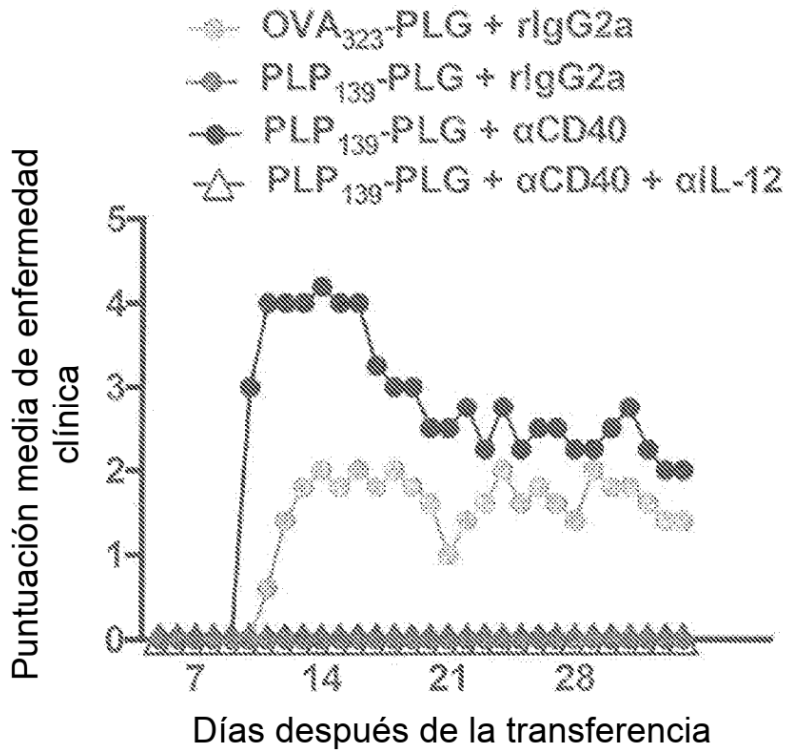


Figura 17



Día 0 - administración i.v. de 3×10^6 blastocitos T activados con PLP₁₃₉₋₁₅₁
 Día +2 - administración i.v. de PLG NP encapsulados en PLP₁₃₉₋₁₅₁
 Días +2,+4,+6,+8,+10,+12 - anti-PD-1 250 μ g

Figura 18



Día 0 - administración i.v. de 3×10^6 blastocitos T activados con PLP₁₃₉₋₁₅₁
 Día +2 - administración i.v. de PLG NP encapsulados en PLP₁₃₉₋₁₅₁
 Día +3 - anti-PD-1 100 µg

Figura 19

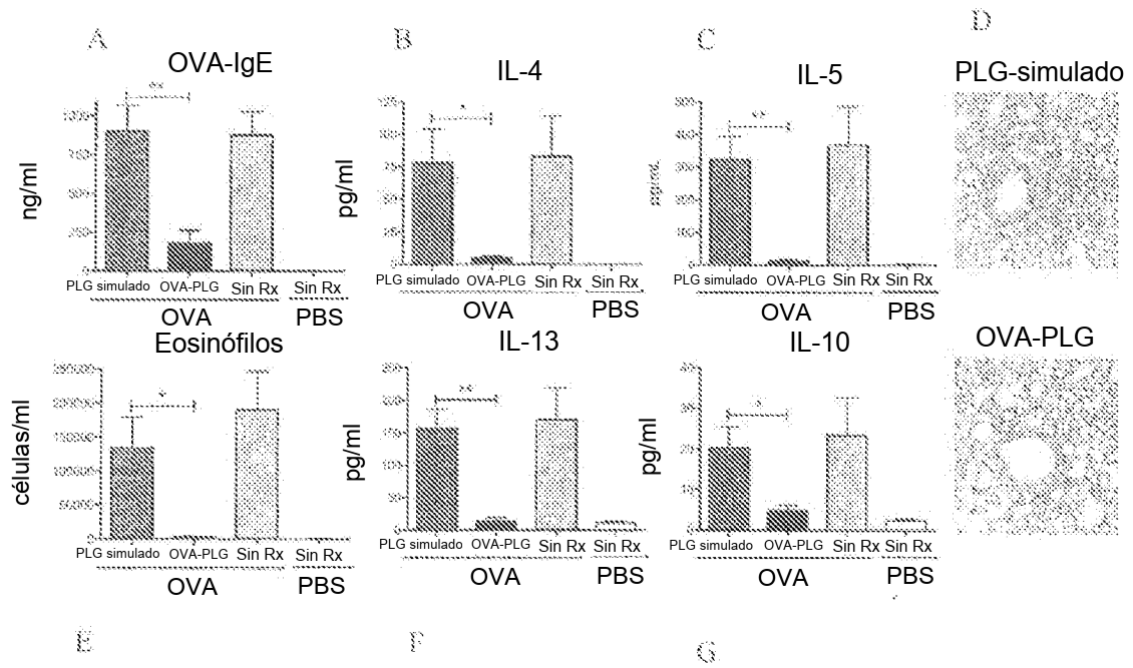


Figura 20

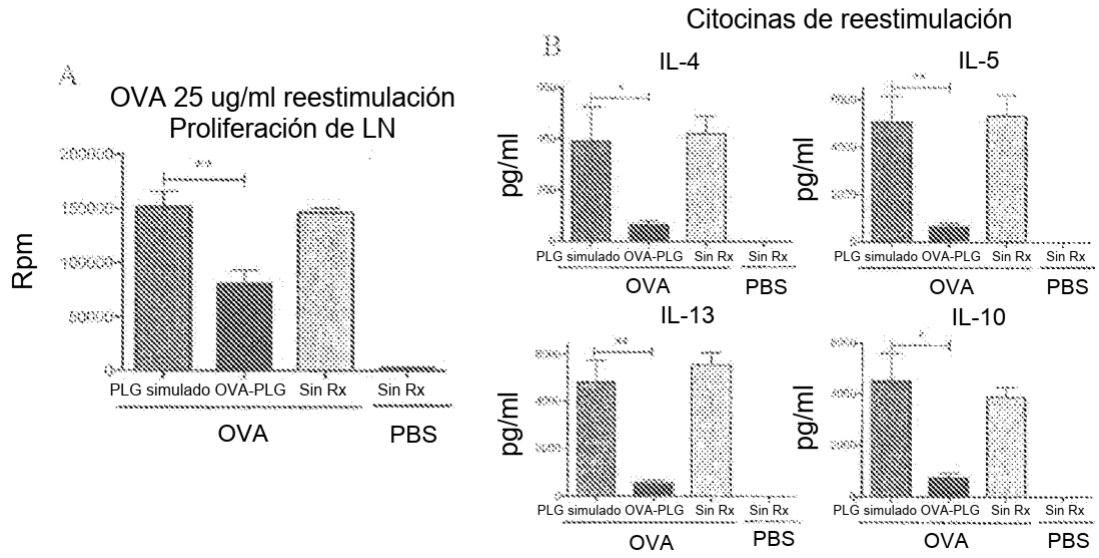


Figura 21

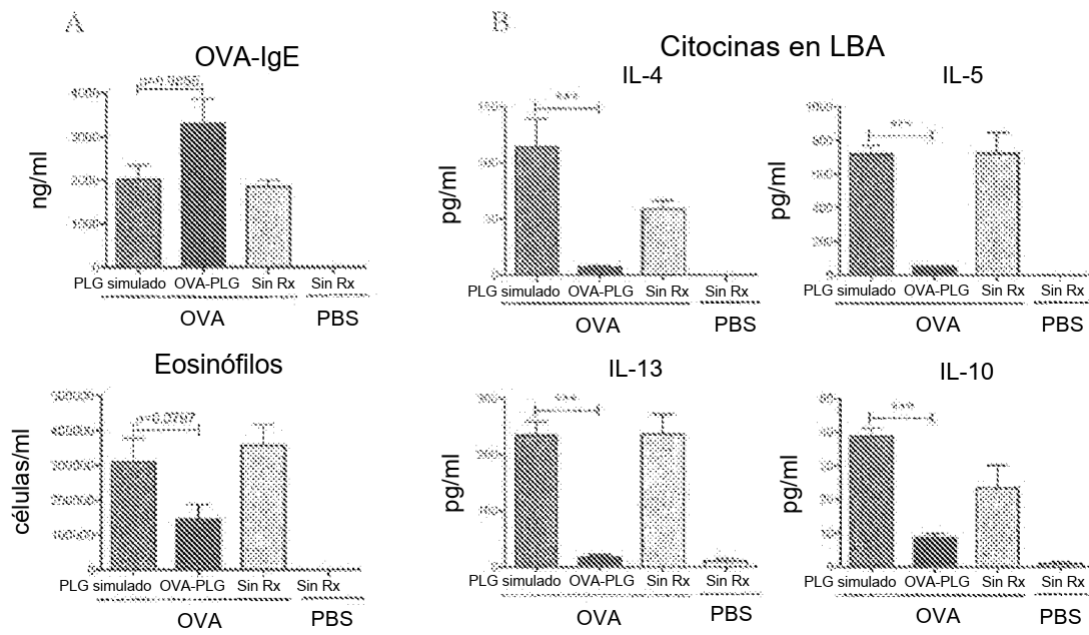


Figura 22

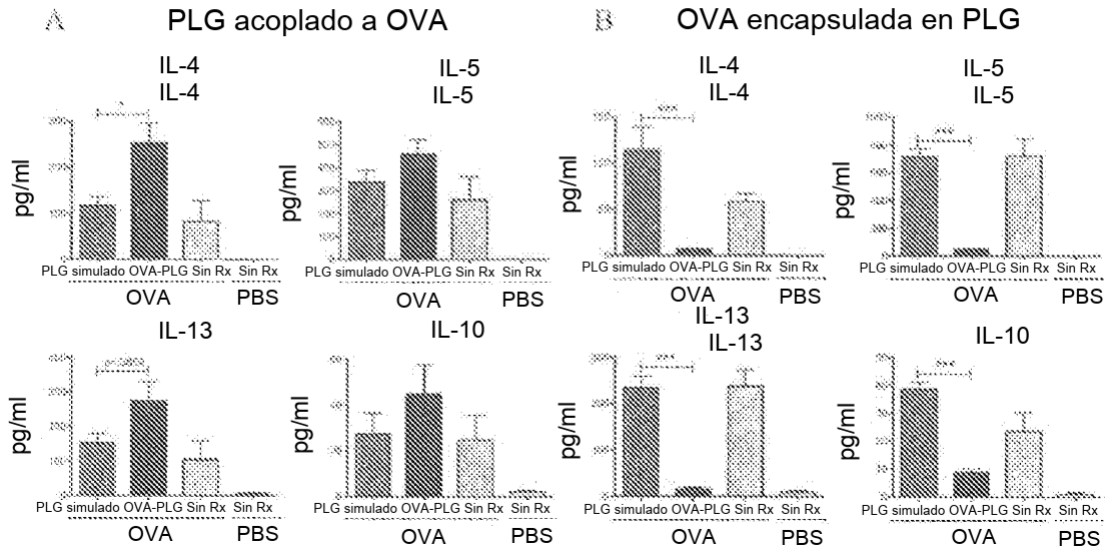
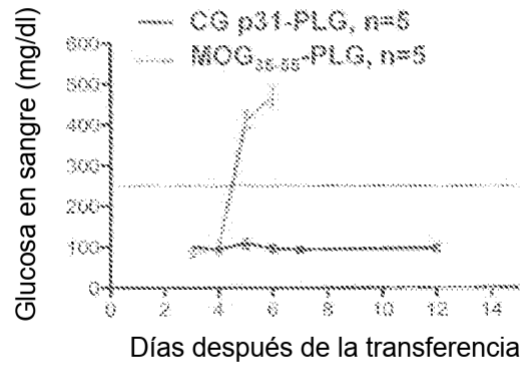
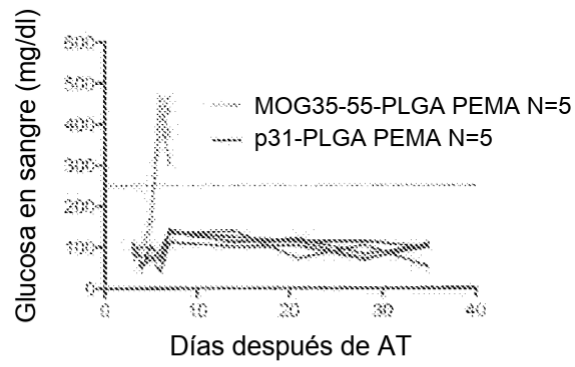


Figura 23

A



B



C

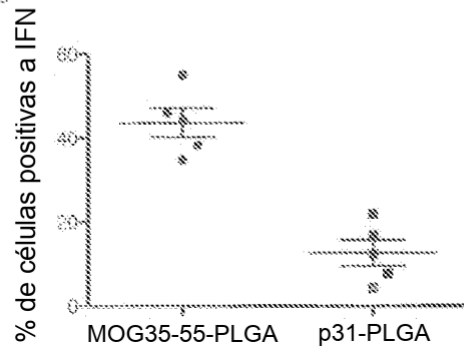
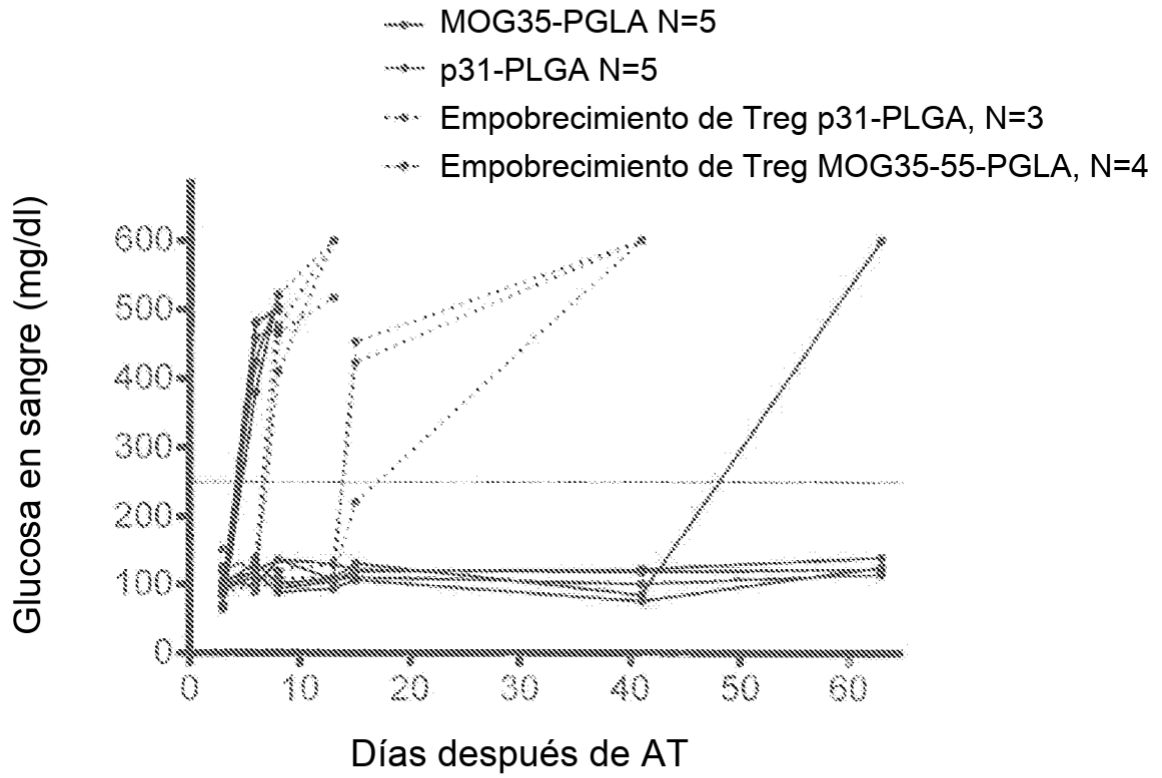


Figura 24

A



B

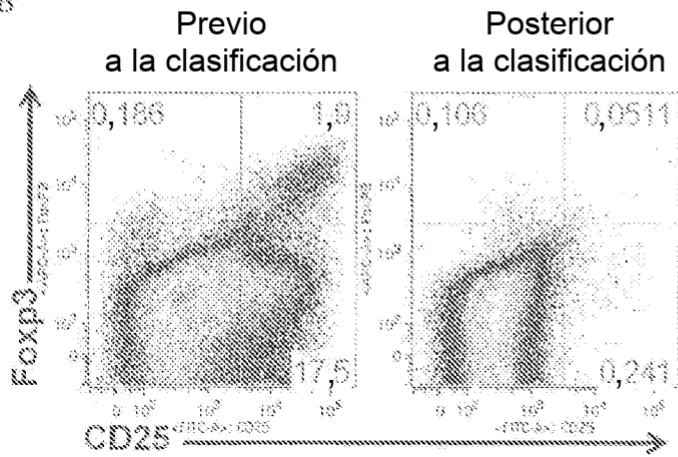


Figura 25

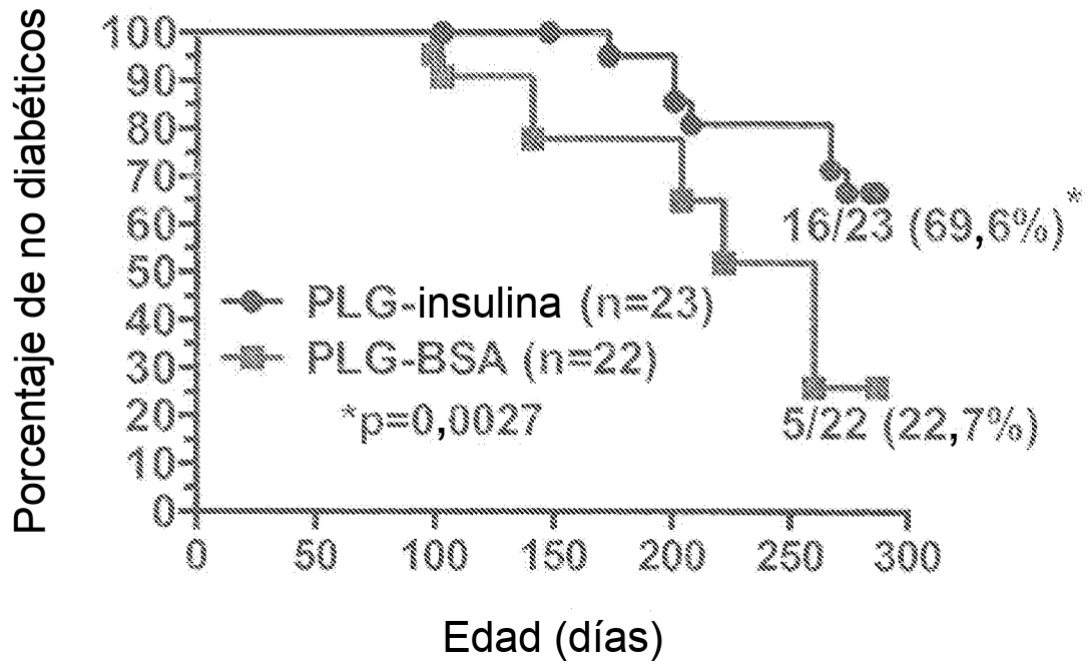


Figura 26

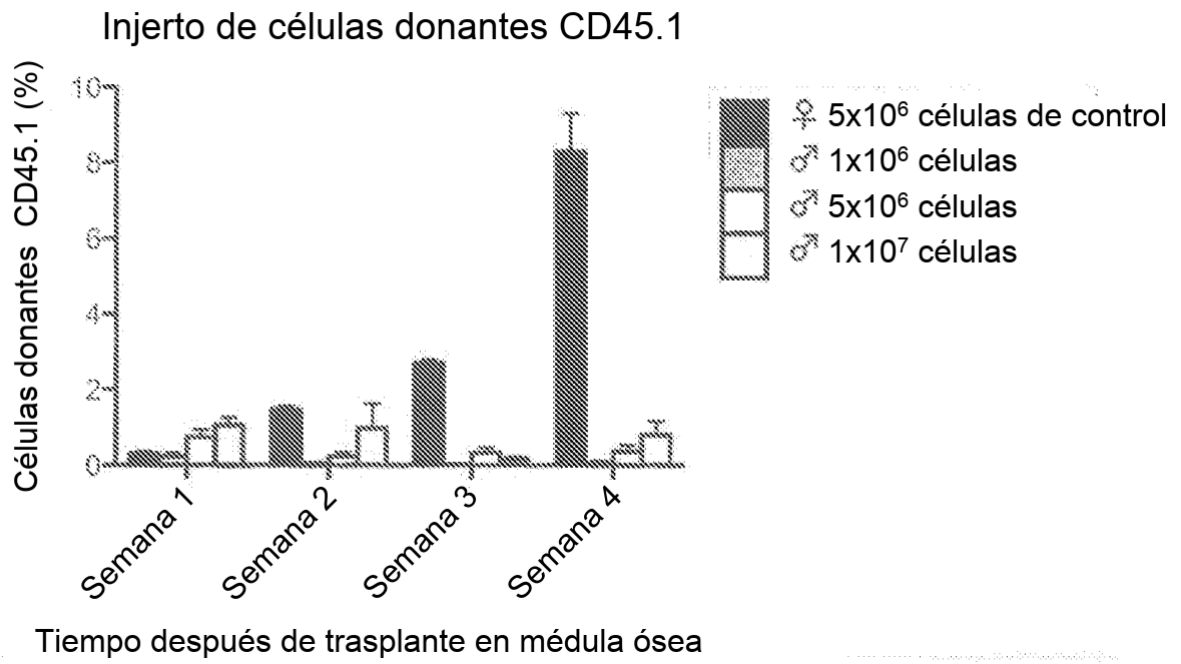


Figura 27

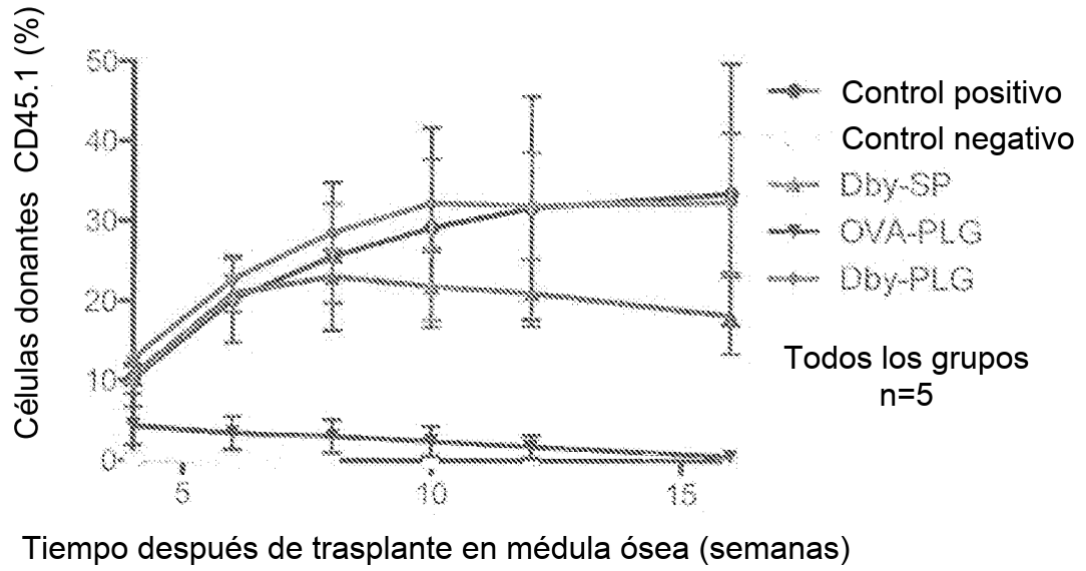


Figura 28

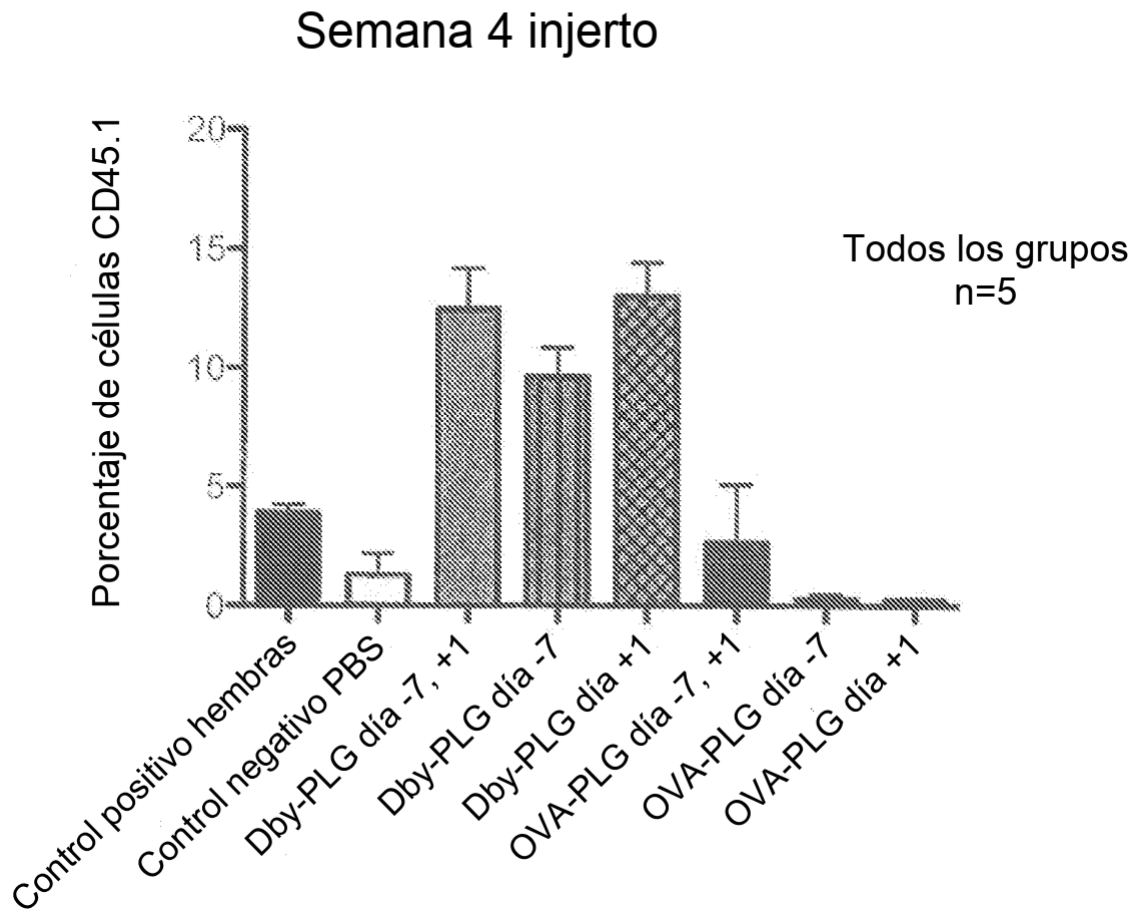


Figura 29

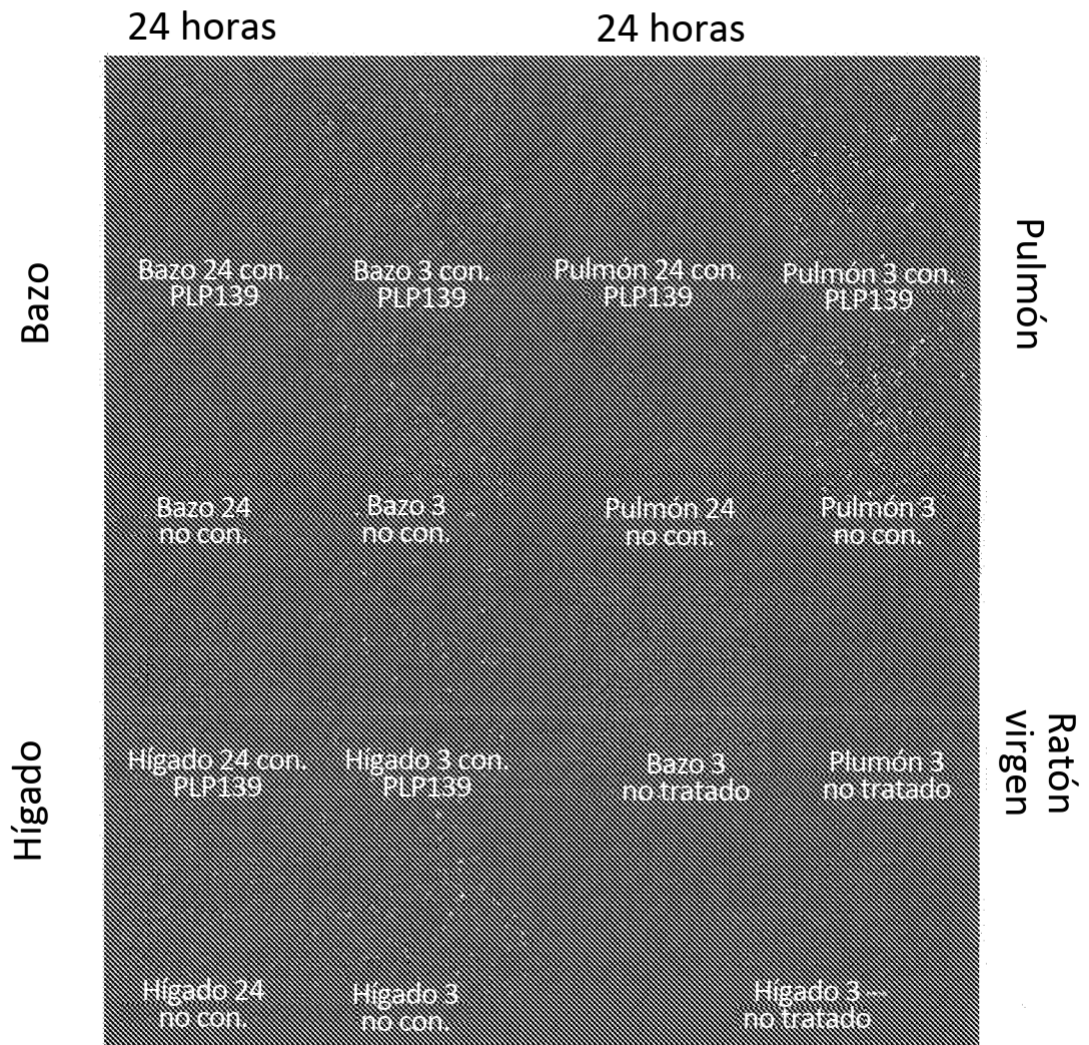


Figura 30

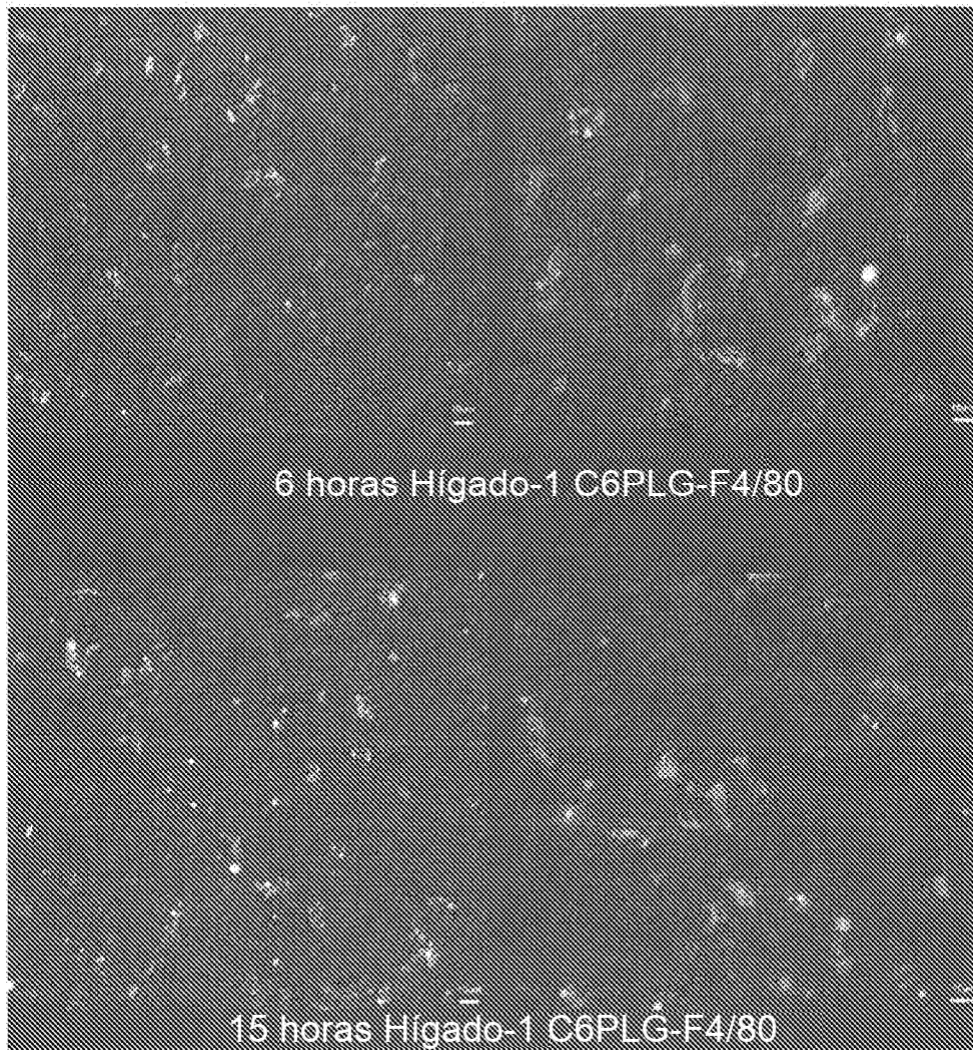


Figura 31

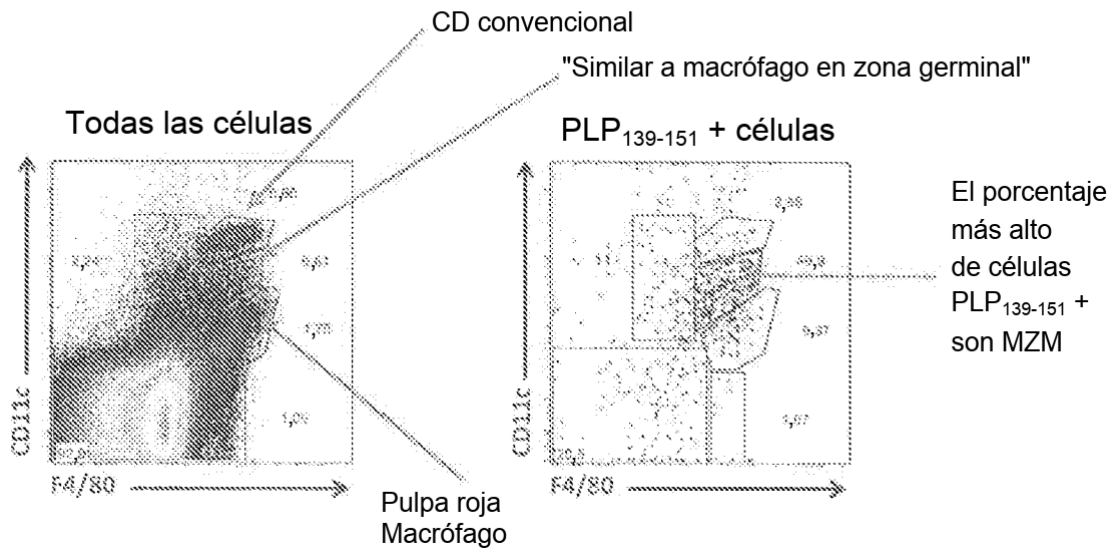


Figura 32

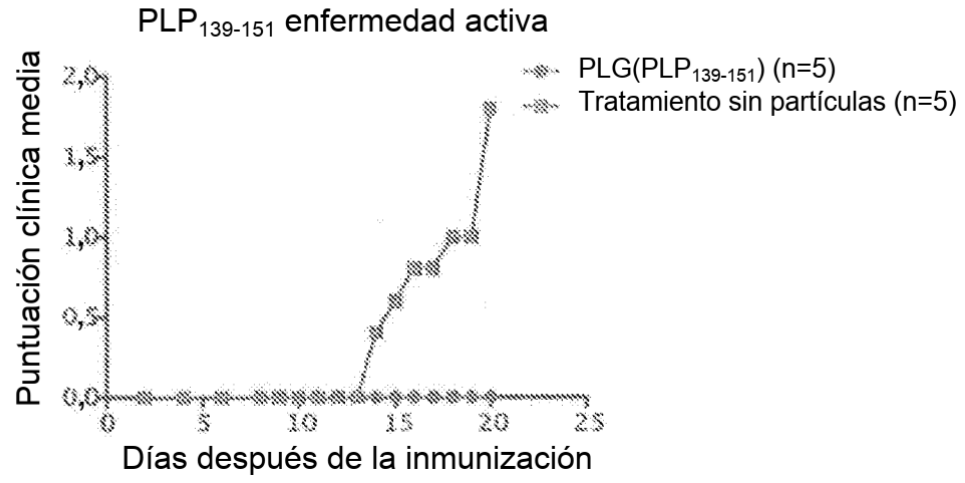


Figura 33

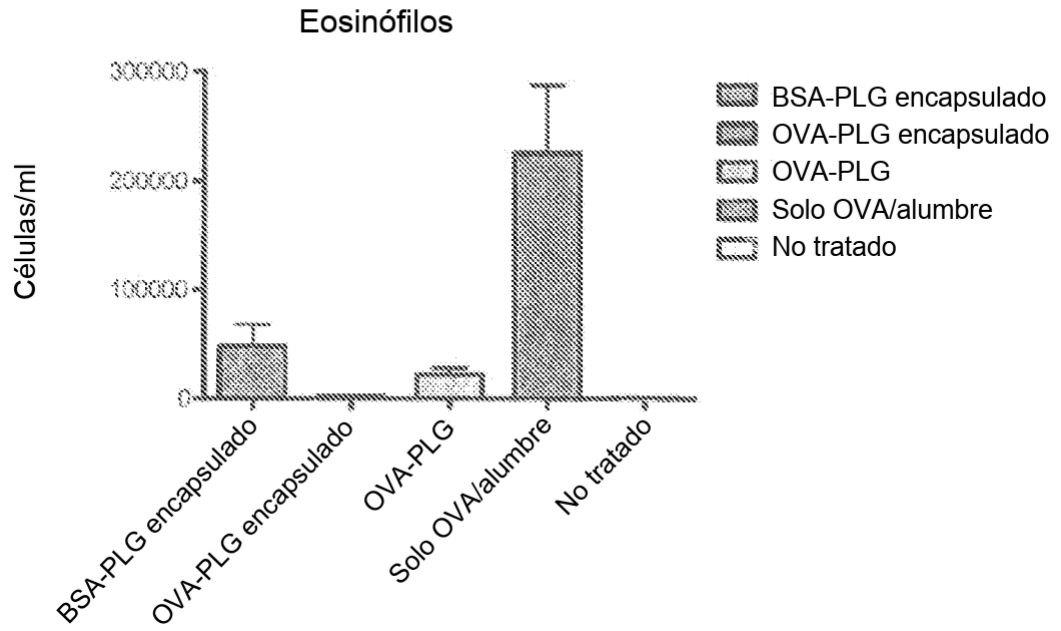


Figura 34

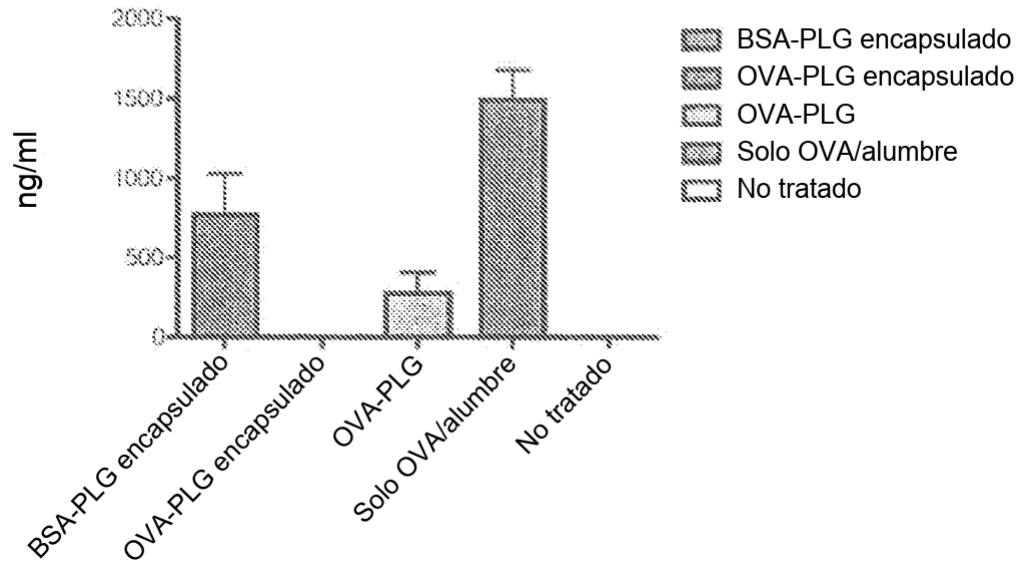


Figura 35

	Tamaño (d.nm):	% de intensidad:	Desv. típica (d.nm):
Promedio Z (d.nm): 697,0	Pico 1: 697,0	100,0	202,7
Pes: 0,162	Pico 2: 0,000	0,0	0,000
Intersección: 0,957	Pico 3: 0,000	0,0	0,000

Calidad de resultado: buena

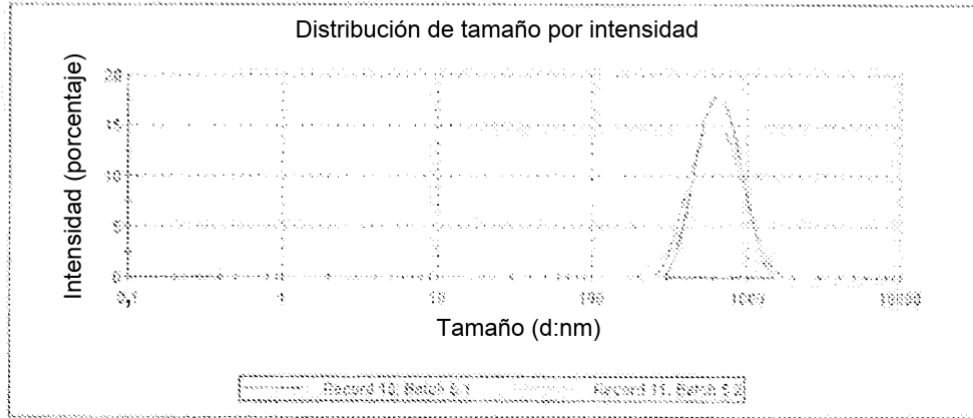


Figura 36

	Media (mV)	Área (%)	Desv. típica (mV)
Potencial zeta (mV): 48,9	Pico 1: -48,9	100,0	5,14
Desviación zeta (mV): 5,14	Pico 2: 0,00	0,0	0,00
Conductividad (mS/cm): 0,00	Pico 3: 0,00	0,0	0,00
Calidad de resultado: 100%			

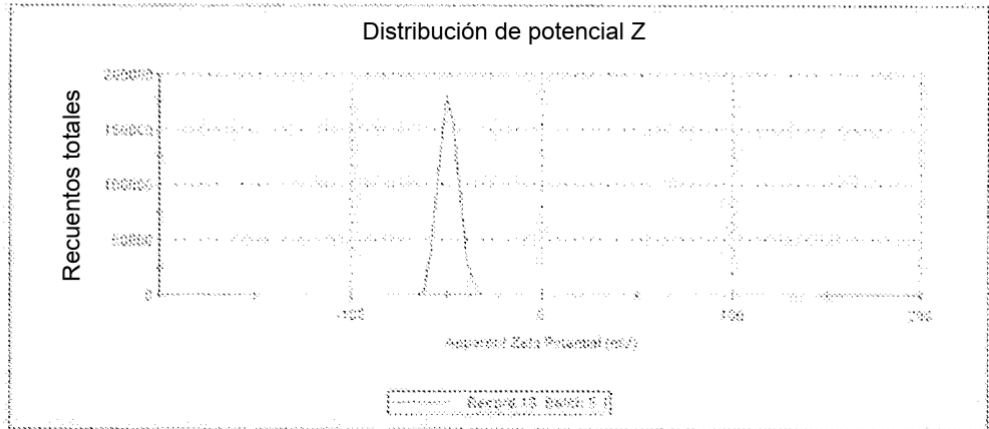


Figura 37

	Tamaño (d.nm):	% de intensidad:	Desv. típica (d.nm):
Promedio Z (d.nm): 597,7	Pico 1: 700,3	100,0	301,2
Desv. típica (d.nm): 0,000	Pico 2: 0,000	0,0	0,000
Intersección: 0,000	Pico 3: 0,000	0,0	0,000

Calidad de resultado: buena

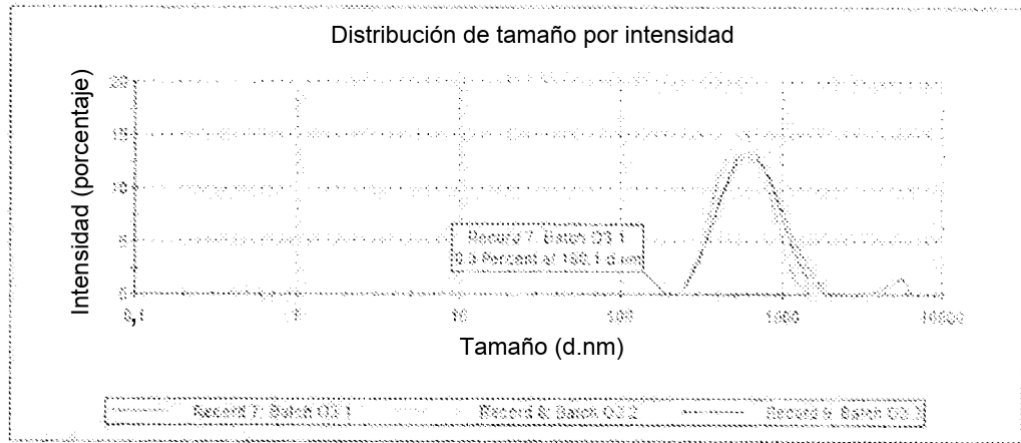


Figura 38

	Media (mV)	Área (%)	Desv. típica (mV)
Potencial zeta (mV): 12,8	Pico 1: -0,2	100,0	5,38
Desviación zeta (mV): 5,38	Pico 2: 0,00	0,0	0,00
Conductividad (mS/cm): 0,0937	Pico 3: 0,00	0,0	0,00
Calidad de resultado: 0,00			

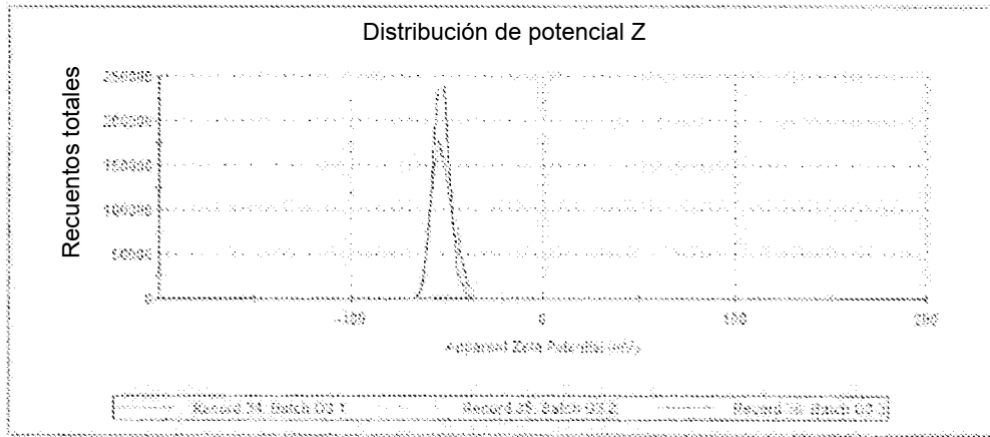


Figura 39

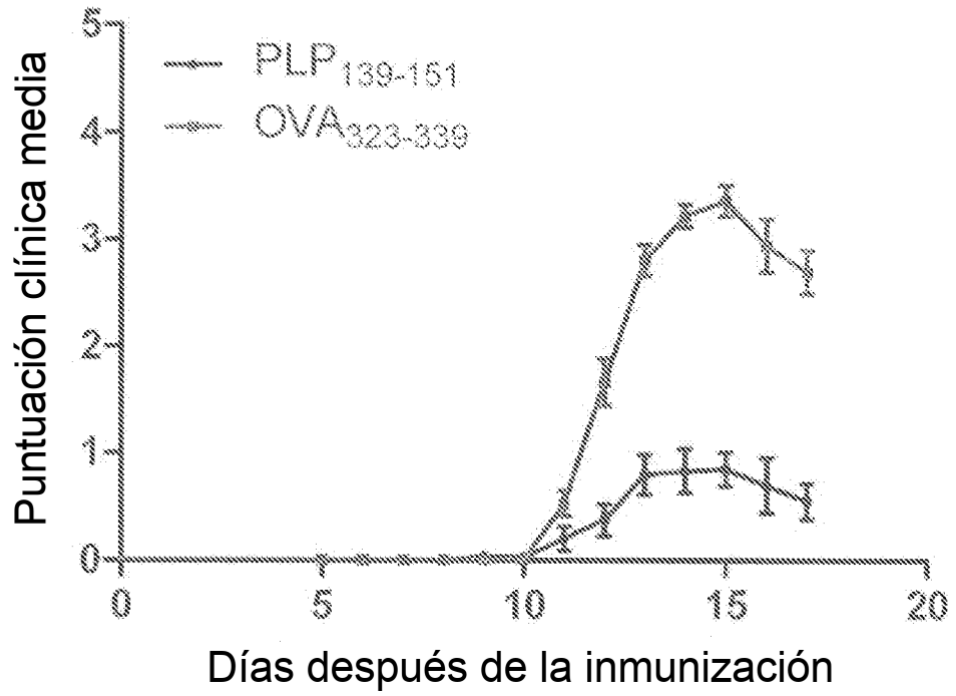


Figura 40

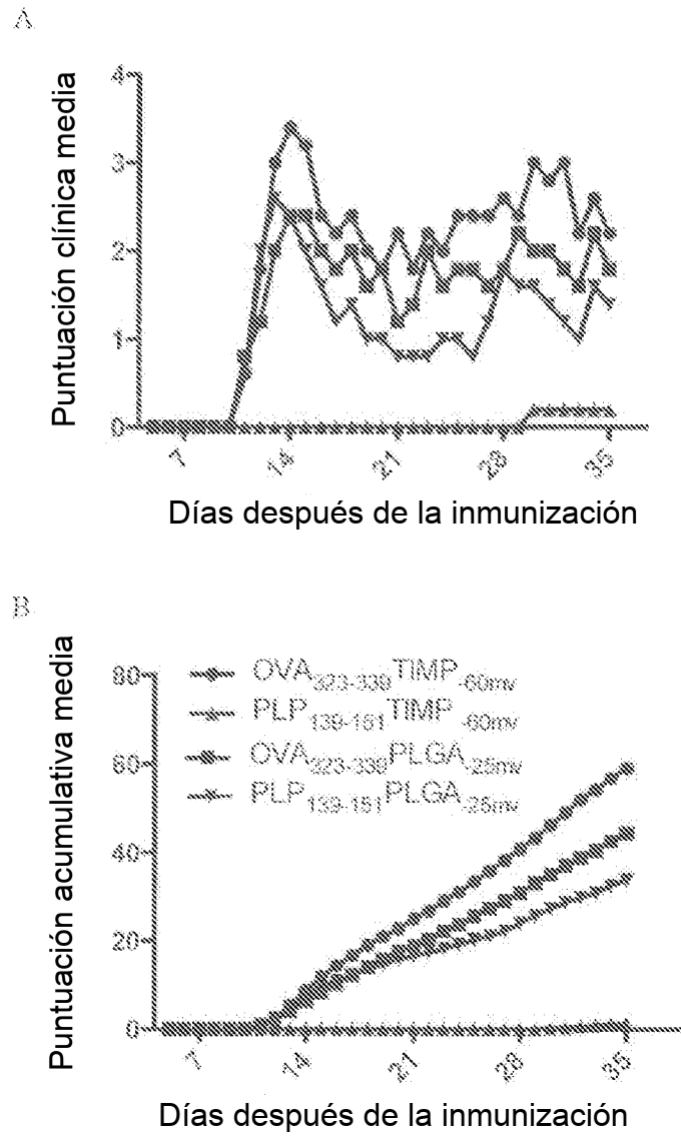


Figura 41A

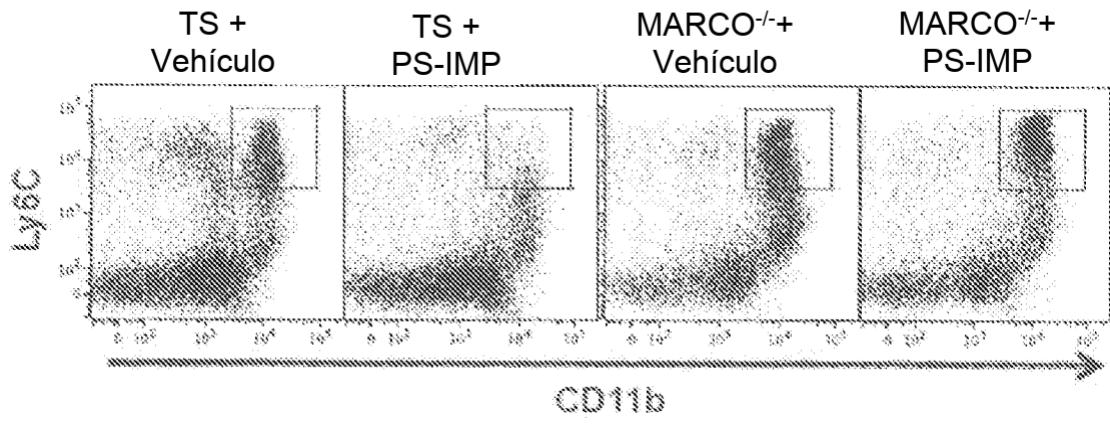


Figura 41B

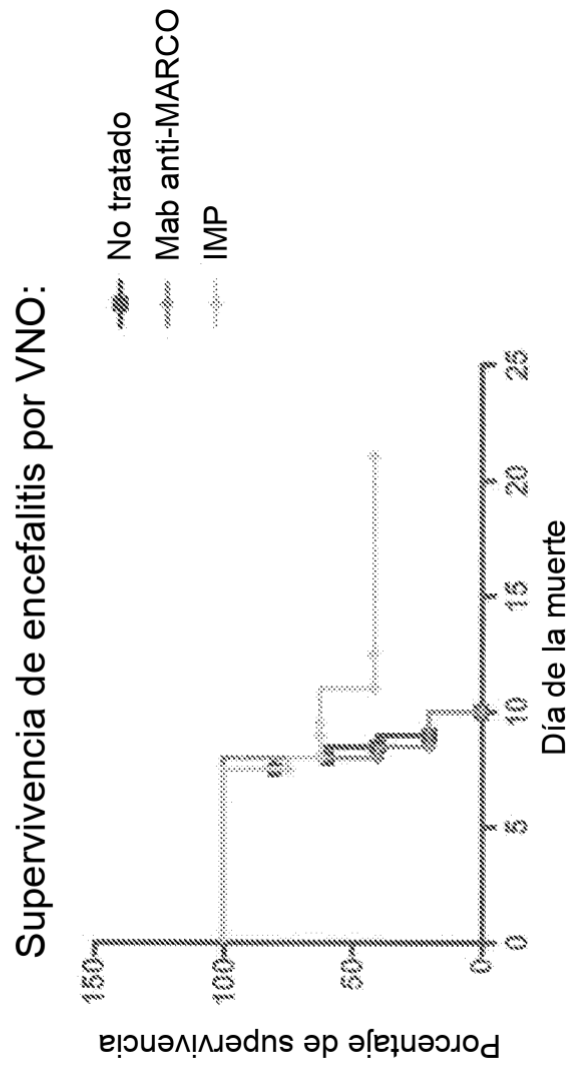


Figura 42

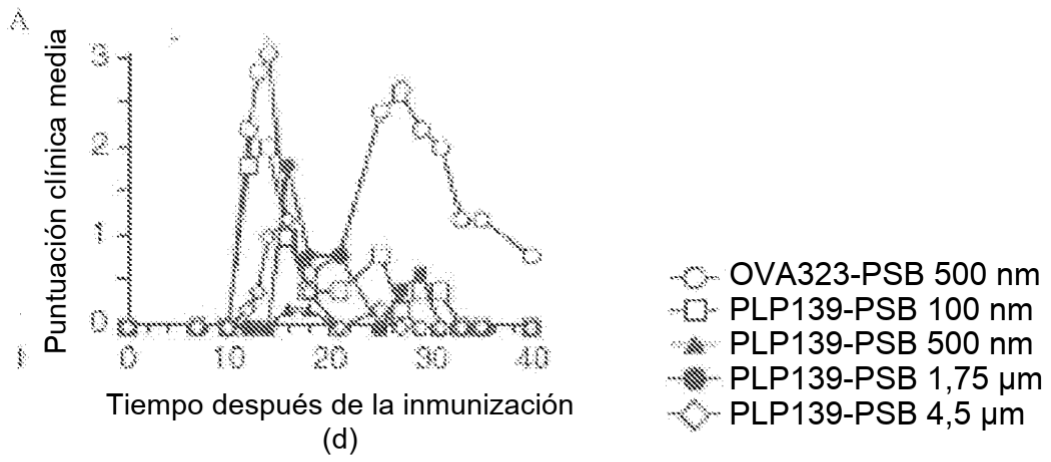


Figura 43

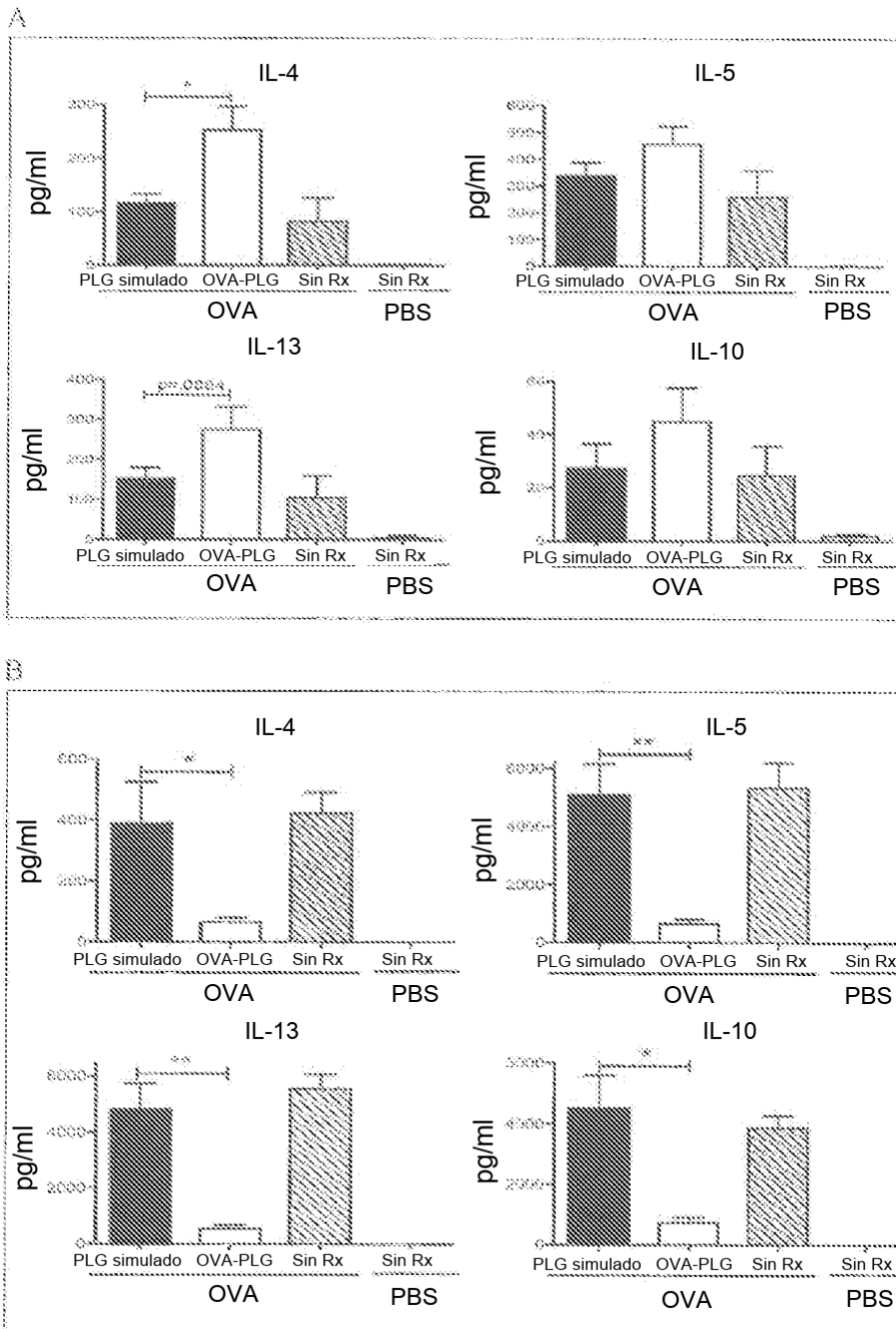


Figura 43 C

