

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 773**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**C07K 14/755** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2013** **PCT/IB2013/000684**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013** **WO13121296**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2013** **E 13721386 (4)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020** **EP 2814500**

54 Título: **Productos terapéuticos de unión a los eritrocitos**

30 Prioridad:

**15.02.2012 US 201213397202**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.09.2020**

73 Titular/es:

**ECOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE  
LAUSANNE (EPFL) (100.0%)  
Quartier de l'Innovation - J  
1015 Lausanne, CH**

72 Inventor/es:

**HUBBELL, JEFFREY, A.;  
KONTOS, STEPHANE y  
DANE, KAREN, Y.**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 781 773 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

Productos terapéuticos de unión a los eritrocitos

5 Campo técnico de la invención

El campo técnico se refiere a las composiciones médicas y sus usos para los ligandos o los anticuerpos que se unen a los eritrocitos. Los usos específicos incluyen la tolerancia inmunitaria, la administración de fármacos y las terapias contra el cáncer.

10

Antecedentes

15

El rechazo del tejido trasplantado y las enfermedades autoinmunitarias son afecciones patológicas que implican un inmunorechazo de una biomolécula extraña debido a su naturaleza antigénica. Muchos fármacos y procesos clínicos se involucran en la supresión o el tratamiento del inmunorechazo. Las vacunas aprovechan este proceso al estimular una respuesta inmunitaria hacia los antígenos en las biomoléculas patógenas para desarrollar la respuesta del sistema inmunitario contra las proteínas u otras biomoléculas que transportan el antígeno.

20

Kontos, Stephane, Engineering Erythrocyte Affinity for Improved Pharmacokinetics and Immune Tolerogenesis, THESIS, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, 23 de junio de 2011, se refiere a un péptido ERY que se une a los eritrocitos de ratón con alta especificidad in vivo. Una fusión recombinante de ERY y la ovoalbúmina unida a los eritrocitos circulantes induce tolerancia inmunitaria hacia el antígeno ovoalbúmina.

25

Resumen de la invención

30

La tolerogénesis es un proceso de generación de tolerancia inmunológica a una sustancia. Un paciente, humano o no humano, que se trata para generar la tolerancia a una sustancia tendrá una respuesta inmunitaria adaptativa reducida a la sustancia. La reducción en una respuesta inmunitaria adaptativa puede medirse mediante el análisis de las cantidades de anticuerpos circulantes reactivos a la sustancia, o mediante el análisis de las reacciones de las células T a la sustancia y el agente tolerizante. En la presente descripción se proporcionan las composiciones y los métodos para la inducción de tolerancia. Muchas de las modalidades implican la administración de una molécula de fusión que tiene un antígeno tolerizante combinado con un grupo de unión a los eritrocitos. La molécula de fusión se une a los eritrocitos y comienza un proceso de presentación del antígeno tolerizante al sistema inmunitario de una manera que genera tolerancia.

35

Se han descubierto péptidos que se unen específicamente a los eritrocitos (también conocidos como glóbulos rojos). Estos ligandos peptídicos son grupos de unión a los eritrocitos que se unen específicamente a los eritrocitos incluso en presencia de otros factores presentes en la sangre. Estos ligandos pueden usarse de varias maneras.

40

Un ejemplo es una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una fusión molecular que comprende un antígeno tolerogénico y un grupo de unión a los eritrocitos que se une específicamente a un eritrocito en el paciente, en donde el grupo de unión a los eritrocitos se une específicamente a una biomolécula que se elige del grupo que consiste en banda 3 (CD233), aquaporin-1, Glut-1, antígeno Kidd, RhAg/Rh50 (CD241), Rh (CD240), Rh30CE (CD240CE), Rh30D (CD240D), Kx, glicoforina B (CD235b), glicoforina C (CD235c), glicoforina D (CD235d), Kell (CD238), Duffy/DARCI (CD234), CR1 (CD35), DAF (CD55), globosida, CD44, ICAM-4 (CD242), Lu/B-CAM (CD239), XG1/XG2 (CD99), EMMPRIN/neurotelina (CD 147), JMH, glicosiltransferasa, Cartwright, Dombrock, C4A/CAB, Scianna, MER2, estomatina, BA-1 (CD24), GPIV (CD36), CD 108, CD 139, y antígeno H (CD 173).

45

50

Una modalidad de la invención es una composición farmacéuticamente aceptable que comprende: un grupo de unión a los eritrocitos unido a un dominio que se une específicamente a una diana, por ejemplo, una proteína que comprende un antígeno tolerogénico. Uno o ambos de estos dominios pueden ser un ligando peptídico.

55

En la presente descripción también se describe una composición farmacéuticamente aceptable para su uso en la reducción de anticuerpos o de otra manera la eliminación de anticuerpos de la circulación en un paciente. La composición tiene un grupo de unión a los eritrocitos unido a un antígeno, por ejemplo, un autoantígeno nativo o un antígeno para una proteína terapéutica.

Breve descripción de las figuras

60

La Figura 1 muestra el esquema experimental y los resultados para la fusión molecular de ERY 1 y ovoalbúmina (OVA), en donde la fusión ERY1-OVA se une a la periferia ecuatorial de los eritrocitos de ratón con alta afinidad; Panel (a) Esquema de la conjugación del péptido ERY1 con ovoalbúmina (OVA), que da como resultado la unión a la glicoforina A de la superficie de los eritrocitos; Panel (b) Unión de cada conjugado de OVA y producto intermedio, caracterizados por citometría de flujo; histograma relleno de negro, ERY1-OVA; histograma vacío, SMCC-OVA; histograma punteado, MIS-OVA; ERY1 = péptido de unión a los eritrocitos WMVLPWLPGLTD (SEQ ID NO: 1), MIS = péptido no compatible PLLTVGMDLWPW (SEQ ID NO: 2), SMCC = sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, usado

65

para conjugar ERY1 a OVA; Panel (c) Equilibrio de unión de ERY1-OVA a los eritrocitos que demuestra la baja constante de disociación de ERY1-OVA ( $R^2 = 0,97$ , unión en un sitio), determinado por citometría de flujo.

La Figura 2 es un montaje de los resultados que muestran que la unión a los eritrocitos induce tolerancia a la estimulación con el antígeno: Panel (a) El modelo de tolerancia de transferencia adoptiva de células T CD8<sup>+</sup> OTI, que muestra el protocolo experimental para los grupos experimentales, así como también para los grupos de control de la estimulación y los no tratados (n = 5); Panel (b) Detección citométrica de flujo de las poblaciones de células T CD8<sup>+</sup> OTI (CD3 $\epsilon$ <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> CD45.2<sup>+</sup>); Panel (c) Cuantificación de la población de células T CD8<sup>+</sup> OTI en los ganglios linfáticos de drenaje (inguinal y poplíteo) 4 días después de la estimulación con el antígeno en ratones CD45.1<sup>+</sup> (\*\* P < 0,01); Panel (d) Detección citométrica de flujo de células T CD8<sup>+</sup> OTI que expresan IFN $\gamma$ ; Panel (e) Células T CD8<sup>+</sup> OTI que expresan IFN $\gamma$  en los ganglios linfáticos de drenaje 4 días después de la estimulación con el antígeno y la reestimulación con el péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 3) (\*\* P < 0,01); Panel (f) Concentraciones de IFN $\gamma$  en medios de cultivo de células de ganglios linfáticos 4 días después de la reestimulación con el péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 3), determinado por ELISA (\*\* P < 0,01); Panel (g) Concentraciones de IL-10 en medios de cultivo de células de ganglios linfáticos 4 días después de la reestimulación con OVA, determinado por ELISA (\* P < 0,05). Los datos representan la mediana  $\pm$  min a máx; Panel (h) Títulos de IgG sérica específica a OVA en el día 19, (\* P < 0,05) los datos representan la media  $\pm$  SE; Panel (i) La combinación del modelo de tolerancia del tumor de timoma EL4 (E.G7-OVA) que expresa OTI y OVA, que muestra el protocolo experimental para los grupos experimentales, así como también los grupos de control (n = 4, 3, respectivamente); Panel (j) Cuantificación de células T CD8<sup>+</sup> OTI no proliferantes (generación 0) que circulan en la sangre 5 días después de la transferencia adoptiva; los datos representan la mediana  $\pm$  min a máx (\*\* P < 0,01); Panel (k) Perfil de crecimiento de tumores E.G7-OVA inyectados por vía subcutánea 9 días después de la transferencia adoptiva de OTI, los datos representan la media  $\pm$  SE (\* P < 0,05).

La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra cómo la unión a los eritrocitos atenúa las respuestas humores específicas al antígeno en ratones C57BL/6. Detección de IgG específica a OVA en suero 19 días después de dos administraciones de 1  $\mu$ g de OVA o 1  $\mu$ g de ERY1-OVA con 6 días de diferencia en ratones C57BL/6 (\* P  $\leq$  0,05).

La Figura 4 presenta los resultados experimentales en donde PEG-ERY1 de 8 brazos se une a los eritrocitos in vitro e in vivo; Panel (a) PEG-ERY1 de 8 brazos (histograma con relleno negro), pero no PEG-MIS de 8 brazos (histograma con relleno gris) o PEG-piridildisulfuro de 8 brazos, se une a los eritrocitos de ratón después de la incubación in vitro; Panel (b) PEG-ERY1 de 8 brazos (histograma relleno de negro), pero no el PEG-MIS de 8 brazos (histograma relleno de gris), se une a los eritrocitos circulantes tras la inyección intravenosa.

La Figura 5 presenta los resultados experimentales que representan la vida media en la superficie celular de los eritrocitos de PEG-ERY1 de 8 brazos (círculos rellenos) y PEG-MIS de 8 brazos (cuadrados vacíos), determinados por citometría de flujo.

La Figura 6 presenta los resultados experimentales como un gráfico de barras que muestra la unión de los ligandos peptídicos a los eritrocitos humanos.

La Figura 7 presenta los resultados experimentales como un histograma de citometría de flujo. Los eritrocitos de ratón se incubaron con TER119-SIINFEKL (histograma relleno de gris) o albúmina (histograma vacío). La señal fluorescente proviene del anticuerpo anti-6xHis-PE usado en la detección del scFv.

La Figura 8 es un gráfico de los resultados experimentales que muestran las células T CD 8 OT-I proliferantes en el bazo después de la administración intravenosa de: solución salina, OVA, ERY1-OVA o TER119-SIINFEKL. \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001

La Figura 9 es un gráfico de los resultados experimentales que muestra la caracterización fenotípica de las células T CD8 OTI después de la transferencia adoptiva y la administración intravenosa de: solución salina, OVA, ERY1-OVA o TER119-SIINFEKL. Panel izquierdo: inducción de células OTI apoptóticas marcadas por la unión de anexina-V en citometría de flujo; Panel derecho: inducción de células OTI agotadas marcadas por la expresión de PD-1 en citometría de flujo.

La Figura 10 es un gráfico de los resultados experimentales que muestra la caracterización de las células T OTI inflamatorias (IFN $\gamma$ +) en los ganglios linfáticos que drenan el sitio de la estimulación de los ratones inducidos a tolerancia con diversas formulaciones de inyección, según se analizó mediante citometría de flujo.

La Figura 11 es un gráfico de los resultados experimentales que muestran los títulos de IgG sérica específica a asparaginasa (ASNasa) de los ratones que reciben 2 o 6 dosis de ERY1-ASNasa o ASNasa de tipo salvaje, 21 días después de la administración, según lo determinado por ELISA.

La Figura 12 es un gráfico de los resultados experimentales que muestra la proliferación de células T CD4 de ratón transgénico NODBDC2.5 en cocultivo con DCs esplénicas, con diversos aditivos de medios.

La Figura 13 es un gráfico de los resultados experimentales que muestra la cuantificación de las células T CD4 NODBDC2.5 no proliferantes después de la transferencia adoptiva y la administración intravenosa de TER119-ChrA, péptido 1040-p31 libre o solución salina, según lo determinado por citometría de flujo.

#### Descripción detallada de las modalidades preferidas

Se proporcionan diseños moleculares para la tolerogénesis. La proteína u otro antígeno molecular al que se busca tolerancia se forma como un conjugado con un grupo de unión a los eritrocitos. El grupo comprende un ligando peptídico. El conjugado, también denominado fusión molecular, es una proteína de fusión o puede implicar un conector, por ejemplo, un polímero o una micela polimérica o un conjugado de nanopartículas poliméricas.

Los péptidos que se unen específicamente a los eritrocitos se describen en la presente descripción. Estos se proporcionan como ligandos peptídicos que tienen secuencias que se unen específicamente, o como anticuerpos o fragmentos de estos que proporcionan unión específica, a los eritrocitos. Los péptidos pueden prepararse como fusiones moleculares con

agentes terapéuticos, antígenos tolerizantes o péptidos de orientación. Los agentes terapéuticos pueden tener ventajosamente una vida media circulante aumentada in vivo cuando son parte de la fusión. La inmunotolerancia puede generarse mediante el uso de las fusiones y la elección de un antígeno en una sustancia para la que se desea la tolerancia. El término antígeno, en este contexto, significa el antígeno de tamaño completo, un fragmento antigénico de este, o un mimético del antígeno tolerogénico. Las fusiones con los péptidos de orientación dirigen las fusiones hacia la diana, por ejemplo, un tumor, donde los ligandos de unión a los eritrocitos reducen o eliminan completamente el flujo sanguíneo al tumor al reclutar los eritrocitos a la diana.

Por consiguiente, la presente invención se dirige a una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un antígeno, un grupo de unión a los eritrocitos, en donde el grupo de unión a los eritrocitos es un ligando peptídico que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 17, en donde el grupo de unión a los eritrocitos se une covalentemente al antígeno.

Secuencias peptídicas que se unen específicamente a los eritrocitos.

Los péptidos que se unen específicamente a los eritrocitos se han descubierto y reportado por el solicitante en el documento PCT/US2011/047078., incluido un péptido denominado ERY1 que se une específicamente a un eritrocito. También se reportan seis péptidos (ERY19, ERY59, ERY64, ERY123, ERY141 y ERY162) que se unen específicamente a los eritrocitos humanos. El Ejemplo 9 detalla cómo los ligandos peptídicos (ERY64, ERY123 y ERY141) se hicieron parte de una proteína de fusión con un indicador de proteína fluorescente y conservaron sus propiedades de unión específicas. Un ejemplo es un polipéptido sustancialmente puro que comprende una secuencia de aminoácidos de ERY1, o uno de los péptidos de unión a los eritrocitos humanos, o una sustitución conservadora de estos, o un ácido nucleico que lo codifica. Dichos polipéptidos se unen específicamente a los eritrocitos y son un ligando para estos. El ligando es un término que se refiere a un grupo químico que tiene una unión específica a una molécula diana. Una diana se refiere a una molécula, tejido o ubicación predeterminados que el usuario intenta unir con el ligando. Por lo tanto, la administración dirigida a un tejido se refiere a la administración de una molécula u otro material, tal como una célula, al tejido diana deseado. Por consiguiente, las modalidades incluyen las moléculas o las composiciones que comprenden al menos uno de los ligandos que se describen en la presente descripción que se usan para unir un eritrocito. La actividad de unión de un polipéptido a un eritrocito puede determinarse simplemente siguiendo los protocolos experimentales como se describe en la presente descripción. Mediante el uso de tales métodos, pueden determinarse las fuerzas de unión de las variantes de los polipéptidos en relación con ERY1 o un péptido de unión a los eritrocitos humanos en condiciones fisiológicas dadas, por ejemplo, secuencias hechas mediante el uso de sustituciones conservadoras, adición o eliminación de grupos flanqueantes, o cambios o adiciones para ajustar la solubilidad de la secuencia en solución acuosa. Los ligandos peptídicos pueden generarse específicamente para una o más de las siguientes dianas o grupo de dianas: una molécula de la superficie del eritrocito (proteína, glicoproteína), banda 3 (CD233), una glicoforina, más particularmente glicoforina A (CD235a), glicoforina B (CD235b), glicoforina C (CD235c) y glicoforina D (CD235d), aquaporina-1, Glut-1, antígeno Kidd, RhAg/R h50 (CD241), Rh (CD240), Rh30CE (CD240CE), Pvh30D (CD240D), Kx, Kell (CD238), Duffy/DARC (CD234), CR1 (CD35), DAF (CD55), globosida, CD44, ICAM-4 (CD242), Lu/B-CAM (CD239), XG1/XG2 (CD99), EMMPRIN/neurotelina (CD147), JMH, glicosiltransferasa, Cartwright, Dombrock, C4A/CAB, Scianna, MER2, estomatina, BA-1 (CD24), GPIV (CD36), CD108, CD139 y antígeno H (CD173). Las proteínas de la superficie celular de los eritrocitos, ya sea preparaciones purificadas o una mezcla de ellas, pueden seleccionarse para ligandos peptídicos. Las proteínas de la superficie celular de los eritrocitos pueden expresarse de forma recombinante en su forma completa o como dominios parciales fusionados a marcadores que mejoran la expresión o la estabilidad de la proteína. La diana de la proteína recombinante puede inmovilizarse en una placa o perla y usarse como la diana de afinidad para el proceso de selección de la biblioteca. Las proteínas de la superficie celular de los eritrocitos también pueden aislarse a partir de preparaciones celulares de sangre completa, de las cuales pueden inmovilizarse mezclas purificadas o complejas de proteínas de la membrana en una matriz sólida (perla, placa u otra), y usarse como dianas de afinidad para el proceso de selección. Todo el proceso de selección puede realizarse en presencia de una alta concentración de albúmina sérica (por ejemplo, 50 mg/ml) y a 37 °C para reducir los eventos de unión no específicos y seleccionar los péptidos con características de unión favorable en el suero sanguíneo. Los ligandos peptídicos se seleccionan con la máxima preferencia de banda 3 (CD233), glicoforina B (CD235b), glicoforina C (CD235c) y glicoforina D (CD235d).

Se observó que los ligandos peptídicos se unen a las superficies celulares de los eritrocitos sin alterar la morfología celular y sin la translocación citoplasmática. Los ligandos se distribuyeron a través de la superficie celular y estaban libres de agrupamiento. La glicoforina-A (GYP A) fue una proteína específica identificada como la diana de ERY-1. ERY-1 fue reactivo solo con especies de ratones y ratas. Se determinó que los ligandos peptídicos que se unían específicamente a los eritrocitos humanos eran específicos de los eritrocitos humanos y no a otras especies. Se reportó un clon de fago que muestra un péptido de alta afinidad WMVLPWLP GTLD (SEQ ID NO: 1 en la presente descripción llamado ERY1) con la superficie celular de los eritrocitos de ratón. Otros experimentos identificaron los ligandos de unión para los eritrocitos humanos como se muestra en las Tablas 1-2. Seis secuencias unidas específicamente a los eritrocitos humanos. Una séptima secuencia, denominada ERY50, unida a los eritrocitos humanos y también a las células epiteliales/endoteliales.

Tabla 1: Ligandos peptídicos que se unen a los eritrocitos humanos

| Nombre del Péptido                                                  | Secuencia de los péptidos de unión a los eritrocitos humanos | Identificador de secuencia |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------|
| ERY19                                                               | <u>GQSGQ</u> PNSRWIYMTPLSPGIYR <u>GSSGGS</u>                 | SEQ ID NO:4                |
| ERY50                                                               | <u>GQSGQ</u> SWSRAILPLFKIQPV <u>GSSGGS</u>                   | SEQ ID NO:5                |
| ERY59                                                               | <u>GQSGQ</u> YICTSAGFGEYCFID <u>GSSGGS</u>                   | SEQ ID NO:6                |
| ERY64                                                               | <u>GQSGQ</u> TYFCTPTLLGQYCSV <u>GSSGGS</u>                   | SEQ ID NO:7                |
| ERY123                                                              | <u>GQSG</u> HWHCQGPANWV <u>GSSGGS</u>                        | SEQ ID NO:8                |
| ERY141                                                              | <u>GQSGQ</u> FCTVIYNTYTCVPSS <u>GSSGGS</u>                   | SEQ ID NO:9                |
| ERY162                                                              | <u>GQSGQ</u> SVWYSSRGNPLRCTG <u>GSSGGS</u>                   | SEQ ID NO:10               |
| Las partes subrayadas de la secuencia indican secuencias conectoras |                                                              |                            |

Tabla 2: Ligandos peptídicos que se unen a los eritrocitos humanos o de ratón

| Péptido                         |                   | Identificador de secuencia |
|---------------------------------|-------------------|----------------------------|
| ERY19'                          | PNSRWIYMTPLSPGIYR | SEQ ID NO:11               |
| ERY50**                         | SWSRAILPLFKIQPV   | SEQ ID NO:12               |
| ERY59'                          | YICTSAGFGEYCFID   | SEQ ID NO:13               |
| ERY64'                          | TYFCTPTLLGQYCSV   | SEQ ID NO:14               |
| ERY123'                         | HWHCQGPANWV       | SEQ ID NO:15               |
| ERY141'                         | FCTVIYNTYTCVPSS   | SEQ ID NO:16               |
| ERY162'                         | SVWYSSRGNPLRCTG   | SEQ ID NO:17               |
| ERY1**                          | WMVLPWLPGLTD      | SEQ ID NO: 1               |
| *no específico para eritrocitos |                   |                            |
| **para ratón                    |                   |                            |

Las modalidades de la invención incluyen los péptidos que se unen específicamente a la superficie de los eritrocitos. Las secuencias no se optimizaron para la longitud mínima. Dicha optimización está dentro de la habilidad de la técnica y puede practicarse mediante el uso de las técnicas descritas en la presente descripción. Por ejemplo, Kenrick y otros, (Protein Eng. Des. Sel. (2010) 23 (1): 9-17) seleccionaron de una biblioteca de 15 residuos, y luego identificaron las secuencias mínimas de unión de 7 residuos de longitud. Getz (ACS Chem. Biol., 26 de mayo de 2011) identificó los dominios mínimos de unión tan pequeños como 5 residuos de longitud. Los péptidos de unión a los eritrocitos pueden estar presentes en repeticiones de las mismas secuencias, por ejemplo, entre 2 y 20 repeticiones; los expertos apreciarán de inmediato que se contemplan todos los intervalos y los valores dentro de los intervalos explícitamente establecidos. Además, los péptidos pueden estar presentes en combinación, con dos o más secuencias distintas en el mismo péptido o formando parte de una fusión molecular única.

Se espera que el número de residuos consecutivos que proporcionan unión específica esté entre aproximadamente 4 y 12 residuos. Por consiguiente, en la Tabla 2 se describen todos los péptidos de cuatro residuos consecutivos de longitud encontrados, así como todos los péptidos de, por ejemplo, 5, 6, 7 u 8 residuos consecutivos. Este número se basa en el número de residuos para otros ligandos peptídicos de unión a proteínas. Las modalidades de la invención incluyen las secuencias de longitud mínima para una de las SEQ ID de unión a los eritrocitos establecidas en la presente descripción, que incluye la Tabla 1. Por consiguiente, ciertas modalidades se dirigen a una composición que comprende un péptido, o un péptido aislado (o purificado), que comprende un número de secuencias de aminoácidos consecutivos entre 4 y 12 residuos de aminoácidos consecutivos de una secuencia que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, y las sustituciones conservadoras de estas, en donde dicha secuencia se une específicamente a un eritrocito. Alternativamente, el número de residuos consecutivos puede elegirse entre aproximadamente 5 y aproximadamente 18; los expertos apreciarán de inmediato que se contemplan todos los intervalos y los valores dentro de los intervalos explícitamente establecidos, por ejemplo, 7, 8, 9, 10 o de 8 a 18. La secuencia de unión a los eritrocitos puede tener, por ejemplo, una sustitución conservadora de al menos uno y no más de dos aminoácidos de las secuencias, o 1, 2 o 3 sustituciones, o entre 1 y 5 sustituciones. Además, se puede lograr con frecuencia la sustitución de L-aminoácidos en la secuencia descubierta con D-aminoácidos, como en Giordano. El péptido o la composición puede, en algunas modalidades, consistir esencialmente en una secuencia que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 17. El péptido

- puede tener una longitud limitada, por ejemplo, tener una cantidad de residuos entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100; los expertos apreciarán de inmediato que se contemplan todos los intervalos y los valores dentro de los intervalos explícitamente establecidos, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 o de aproximadamente 15 a aproximadamente 80. Puede proporcionarse un grupo peptídico de unión a los eritrocitos que comprenda un ligando peptídico que tenga una constante de disociación de entre aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  y 0,1 nM según se determina mediante las mediciones del equilibrio de unión entre el péptido y los eritrocitos; los expertos apreciarán de inmediato que se contemplan todos los intervalos y los valores dentro de los intervalos explícitamente establecidos, por ejemplo, de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1 nM. El péptido puede comprender además un agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser, por ejemplo, una proteína, un componente biológico, un fragmento de anticuerpo, un scFv o un péptido. El péptido puede comprender además un antígeno tolerogénico, por ejemplo, una proteína humana usada en un humano deficiente de esa proteína (por ejemplo, factores sanguíneos tales como el factor VIII o el factor IX), proteínas con glicosilación no humana, proteínas sintéticas que no se encuentran de forma natural en los humanos, alérgenos alimentarios humanos o antígenos autoinmunitarios humanos.
- Los polipéptidos de varias longitudes pueden usarse según sea apropiado para la aplicación particular. En general, los polipéptidos que contienen las secuencias de ligandos del polipéptido exhibirán unión específica si el polipéptido está disponible para la interacción con los eritrocitos in vivo. Los péptidos que tienen el potencial de plegarse pueden probarse mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción. Por consiguiente, ciertas modalidades se dirigen a los polipéptidos que tienen un ligando de polipéptidos pero que no ocurren en la naturaleza, y ciertas otras modalidades se dirigen a los polipéptidos que tienen longitudes particulares, por ejemplo, de 6 a 3000 residuos, o 12-1000, o 12-100, o 10-50; los expertos apreciarán de inmediato que se contempla cada valor y el intervalo dentro de los límites explícitamente expuestos.
- Ciertas modalidades proporcionan diversas secuencias de polipéptidos y/o polipéptidos purificados o aislados. Un polipéptido es un término que se refiere a una cadena de residuos de aminoácidos, independientemente de la modificación postraduccional (por ejemplo, fosforilación o glicosilación) y/o la formación de complejos con polipéptidos adicionales, la síntesis en complejos de múltiples subunidades, con ácidos nucleicos y/o carbohidratos, u otras moléculas. Por lo tanto, los proteoglicanos también se denominan polipéptidos en la presente descripción. Como se usa en la presente descripción, un "polipéptido funcional" es un polipéptido que es capaz de promover la función indicada. Los polipéptidos pueden producirse mediante varios métodos, muchos de los cuales se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos pueden obtenerse por extracción (por ejemplo, de células aisladas); por expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido; o por síntesis química. Los polipéptidos pueden producirse, por ejemplo, mediante tecnología recombinante y vectores de expresión que codifican el polipéptido introducido en las células huésped (por ejemplo, por transformación o transfección) para la expresión del polipéptido codificado.
- Hay una variedad de cambios conservadores que generalmente pueden hacerse en una secuencia de aminoácidos sin alterar la actividad. Estos cambios se denominan mutaciones o sustituciones conservadoras; es decir, un aminoácido que pertenece a un grupo de aminoácidos que tiene un tamaño o característica particular puede sustituirse por otro aminoácido. Los sustitutos para una secuencia de aminoácidos pueden seleccionarse de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina y tirosina. Los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. No se espera que tales alteraciones afecten sustancialmente el peso molecular aparente según lo determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida o el punto isoelectrico. Las sustituciones conservadoras también incluyen la sustitución de los isómeros ópticos de las secuencias por otros isómeros ópticos, específicamente aminoácidos D por aminoácidos L para uno o más residuos de una secuencia. Además, todos los aminoácidos en una secuencia pueden sufrir una sustitución de isómero de D a L. Las sustituciones conservadoras ejemplares incluyen, pero no se limitan a, Lys por Arg y viceversa para mantener una carga positiva; Glu por Asp y viceversa para mantener una carga negativa; Ser por Thr para que se mantenga un OH libre; y Gln por Asn para que se mantenga un  $\text{NH}_2$  libre. Además, las mutaciones puntuales, las delecciones y las inserciones de las secuencias de polipéptidos o las secuencias de ácido nucleico correspondientes pueden realizarse en algunos casos sin una pérdida de la función del polipéptido o del fragmento de ácido nucleico. Las sustituciones pueden incluir, por ejemplo, 1, 2, 3 o más residuos. Los residuos de aminoácidos descritos en la presente descripción emplean el designador de aminoácidos de una letra o la abreviatura de tres letras. Las abreviaturas usadas en la presente descripción están de acuerdo con la nomenclatura estándar de los polipéptidos, J. Biol. Chem., (1969), 243, 3552-3559. Todas las secuencias de residuos de aminoácidos se representan en la presente descripción por fórmulas con orientación izquierda y derecha en la dirección convencional de amino-terminal a carboxi-terminal.
- En algunos casos, puede ser necesaria una determinación del porcentaje de identidad de un péptido con una secuencia establecida en la presente descripción. En tales casos, el porcentaje de identidad se mide en términos del número de residuos del péptido, o una parte del péptido. Un polipéptido de, por ejemplo, 90 % de identidad, también puede ser una parte de un péptido más grande.
- El término purificado como se usa en la presente descripción con referencia a un polipéptido se refiere a un polipéptido que se ha sintetizado químicamente y, por lo tanto, no está sustancialmente contaminado por otros polipéptidos, o se ha separado o purificado de otros componentes celulares que lo acompañan de forma natural (por ejemplo, otros

polinucleótidos, proteínas celulares, o componentes celulares). Un ejemplo de un polipéptido purificado es uno que tiene al menos un 70 %, en peso seco, libre de proteínas y moléculas orgánicas naturales con las que se asocia de forma natural. Por lo tanto, una preparación de un polipéptido purificado puede ser, por ejemplo, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 99 %, en peso seco, del polipéptido. Los polipéptidos también pueden diseñarse para contener un marcador de secuencia (por ejemplo, un marcador de polihistidina, un marcador myc o un marcador FLAG®) que facilita la purificación o el marcaje del polipéptido (por ejemplo, capturado en una matriz de afinidad, visualizado bajo un microscopio). Por lo tanto, una composición purificada que comprende un polipéptido se refiere a un polipéptido purificado a menos que se indique lo contrario. El término aislado indica que los polipéptidos o ácidos nucleicos de la invención no están en su entorno natural. Los productos aislados de la invención pueden contenerse en un sobrenadante de cultivo, enriquecerse parcialmente, producirse a partir de fuentes heterólogas, clonarse en un vector o formularse con un vehículo, etc.

Los polipéptidos pueden incluir una modificación química; un término que, en este contexto, se refiere a un cambio en la estructura química natural de los aminoácidos. Dichas modificaciones pueden realizarse en una cadena lateral o un terminal, por ejemplo, cambiando el amino terminal o el carboxilo terminal. En algunas modalidades, las modificaciones son útiles para generar grupos químicos que pueden usarse convenientemente para unir los polipéptidos a otros materiales, o para unir un agente terapéutico.

La unión específica, como ese término se usa comúnmente en las técnicas biológicas, se refiere a una molécula que se une a una diana con una afinidad relativamente alta en comparación con los tejidos no diana, y generalmente implica una pluralidad de interacciones no covalentes, como las interacciones electrostáticas, las interacciones de van der Waals, los enlaces de hidrógeno y similares. Las interacciones de unión específica caracterizan la unión anticuerpo-antígeno, la unión enzima-sustrato y específicamente las interacciones de unión proteína-receptor; si bien dichas moléculas pueden unirse a tejidos además de a sus dianas de vez en cuando, se dice que dicha unión carece de especificidad y no es una unión específica. El péptido ERY1 y sus derivados y los péptidos de unión a los eritrocitos humanos y sus derivados pueden unirse a no eritrocitos en algunas circunstancias, pero se ha observado que dicha unión es inespecífica, como lo demuestra la unión mucho mayor de los péptidos a los eritrocitos en oposición a otras células o proteínas.

Por lo tanto, las modalidades incluyen un ligando que se une con especificidad a un eritrocito y no se une específicamente a otros componentes sanguíneos, por ejemplo, uno o más de: proteínas de la sangre, albúmina, fibronectina, plaquetas, glóbulos blancos, sustancialmente todos los componentes encontrados en una muestra de sangre tomada de un humano típico. En el contexto de una muestra de sangre, el término "sustancialmente todo" se refiere a los componentes que están típicamente presentes pero excluye los componentes incidentales en concentraciones muy bajas para que no reduzcan efectivamente el título de los ligandos biodisponibles.

Péptidos de anticuerpos

Además de los péptidos que se unen a los eritrocitos, en la presente descripción también se describen proteínas, específicamente anticuerpos y especialmente fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla. Las técnicas para generar un anticuerpo contra un antígeno se conocen bien. El término antígeno, en este contexto, se refiere a un sitio reconocido por un sistema inmunitario del huésped que responde al antígeno. La selección de antígenos se conoce en las técnicas de generación de anticuerpos, entre otras técnicas. Los ejemplos incluyen el uso de estos péptidos en una fusión molecular y otros métodos presentados en la presente descripción. Los antígenos pueden expresarse de forma recombinante en su forma completa o como dominios parciales fusionados a marcadores que mejoran la expresión o la estabilidad de la proteína. El antígeno proteico recombinante puede inmovilizarse en una placa o perla y usarse como diana de afinidad para el proceso de selección de la biblioteca. Los antígenos también pueden aislarse de preparaciones celulares de sangre completa, a partir de las cuales pueden inmovilizarse mezclas purificadas o complejas de proteínas de membrana en una matriz sólida (perla, placa u otra), y usarse como dianas de afinidad para el proceso de selección.

Los expertos que lean esta descripción podrán generar anticuerpos que se unan específicamente a los eritrocitos. Los Ejemplos 4-6 se refieren a la fabricación de anticuerpos o fragmentos de estos. Se usan numerosas técnicas paralelas para descubrir nuevos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos o para hacer que las composiciones que comprenden dichos fragmentos sean activas hacia los eritrocitos, que incluyen, pero no se limitan a, la presentación en fagos, la presentación en levaduras y la presentación en bacterias. Pueden generarse anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de unión a los eritrocitos adicionales, o scFv específicamente para una o más de las siguientes dianas o grupos de dianas (denominados colectivamente en la presente descripción grupo diana de los eritrocitos) que se eligen del grupo que consiste en banda 3 (CD233), aquaporina-1, Glut-1, antígeno Kidd, RhAg/Rh50 (CD241), Rh (CD240), Rh30CE (CD240CE), Rh30D (CD240D), Kx, glicoforina A (CD235a), glicoforina B (CD235b), glicoforina C (CD235c), glicoforina D (CD235d), Kell (CD238), Duffy/DARC (CD234), CR1 (CD35), DAF (CD55), globosida, CD44, ICAM-4 (CD242), Lu/B-CAM (CD239), XG1/XG2 (CD99), EMMPRIN/neurotelina (CD147), JMH, glicosiltransferasa, Cartwright, Dombrock, C4A/CAB, Scianna, MER2, estomatina, BA-1 (CD24), GPIV (CD36), CD108, CD139 y antígeno H (CD173).

Además, pueden generarse nuevos anticuerpos específicos a los eritrocitos por la inmunización de ratones con preparaciones intactas o proteicas de eritrocitos humanos. Después de la inmunización con la diana formulada en adyuvante, los ratones se sacrifican en momentos predeterminados y sus repertorios de anticuerpos se secuencian y/o sus células B se aíslan para la selección basada en hibridoma. Estos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden

optimizarse mediante varias técnicas in vitro mencionadas anteriormente, para mejorar los parámetros de la unión y/o la estabilidad. Pueden generarse anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de unión a los eritrocitos adicionales mediante el uso de clones de hibridoma de anticuerpos descubiertos previamente para unirse a los eritrocitos. Pueden generarse, por ejemplo, mediante el uso del método usado para generar el scFv TER119. Como plantilla, o como fuente de anticuerpos, pueden usarse los siguientes clones de hibridoma, entre otros: BRIC 4, 5, 6, 10, 14, 18, 39, 66, 68, 69, 87, 108, 110, 111, 125, 126, 128, 145, 155, 157, 163, 170, 198, 203, 216, 220, 221, 222, 229, 230, 231, 235, or 256; BRAC 17, 18; BGRL 1, 2, 11, 100; BRAD 3; BIRMA D6, D10, K3, 84B; 6A7; COE; o KZ1.

El término péptido se usa indistintamente con el término polipéptido en la presente descripción.

Los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos son péptidos. El término fragmento de anticuerpo se refiere a una parte de un anticuerpo que retiene del anticuerpo la función de unión al antígeno. El fragmento puede literalmente fabricarse de una parte de un anticuerpo más grande o alternativamente puede sintetizarse de novo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, por ejemplo, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv). Un scFv es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) de las inmunoglobulinas, conectadas con un péptido conector, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos. El conector puede conectar el N-terminal del VH con el C-terminal del VL, o viceversa. El término scFv incluye scFvs divalentes, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y otras combinaciones de fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos tienen una parte de unión al antígeno denominada paratopo. El término ligando peptídico se refiere a un péptido que no es parte de un paratopo.

La unión de los eritrocitos, por los anticuerpos y los fragmentos de estos, por ligandos peptídicos de unión, y por aptámeros, puede realizarse sin unión covalente a los eritrocitos. La unión puede realizarse in vivo y sin un evento de unión a los eritrocitos ex vivo. Este evento de unión, incluida la asociación resultante de un antígeno con el eritrocito, puede realizarse sin hacer que los eritrocitos sean apoptóticos. El proceso puede realizarse de modo que las moléculas superficiales de los eritrocitos no se reticulen entre sí mediante un agente de reticulación y/o el evento de unión, y no se reticulen mediante enlaces covalentes.

Constructos de proteínas biespecíficas para unir los antígenos a los eritrocitos.

Al generar los constructos de las proteínas que se unen a los eritrocitos, una opción de diseño principal es generar una única proteína o fusión molecular que contenga tanto el antígeno de interés como el grupo de unión a los eritrocitos.

Un diseño alternativo que puede ser más eficiente en la producción y el uso es un constructo de proteína biespecífica o molecular que contiene un dominio que se une a los eritrocitos fusionado a un dominio adicional que se une directa o indirectamente al antígeno de interés. El antígeno de interés real no se incluye en esta fusión molecular, solo un grupo que se une directa o indirectamente al antígeno de interés. Como tal, no existe el requisito para modificar o diseñar el antígeno de interés. Un ejemplo de dicho diseño es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo biespecífico, con un dominio de anticuerpo específico para los eritrocitos, fusionado de forma recombinante a un segundo dominio de anticuerpo que se une específicamente a una biomolécula que tiene el antígeno de interés. Se implementan múltiples constructos de anticuerpos biespecíficos diferentes, que incluyen, pero no se limitan a, scFv en tándem, diacuerpos y moléculas de scFv-IgG en tándem (62). También se usan otros andamios no proteicos, que incluyen nanopartículas poliméricas u otros conjugados poliméricos multivalentes, que se diseñan para una especificidad dual al albergar un dominio que se une al antígeno de interés y otro dominio que se une a los eritrocitos.

Los grupos de afinidad del constructo biespecífico pueden ser cualquier combinación de dominios peptídicos y/o dominios de fragmentos de anticuerpos. Los péptidos que se unen a los eritrocitos o al antígeno proteico diana se obtienen con técnicas convencionales de selección de la biblioteca de péptidos, que incluyen, por ejemplo, la selección de la biblioteca de perlas o péptidos multiplexados, presentación en fagos, presentación en bacterias y presentación en levaduras. El péptido diseñado se caracteriza por su especificidad y afinidad con su diana de unión mediante el uso de ensayos bioquímicos estándar, por ejemplo, ELISA, resonancia de plasmones superficiales y métodos basados en citometría de flujo. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen a los eritrocitos o al antígeno proteico diana se obtienen mediante el uso de las técnicas convencionales, por ejemplo, métodos de selección basados en hibridoma, presentación en fagos, presentación en levaduras, presentación en bacterias, presentación en ribosomas o genes de anticuerpos directos o métodos de secuenciación basados en proteómica de animales inmunizados. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo diseñado se caracteriza por la especificidad y la afinidad con su diana de unión mediante el uso de ensayos bioquímicos estándar, por ejemplo, ELISA, resonancia de plasmones superficiales y métodos basados en citometría de flujo.

Después del descubrimiento y la caracterización de cada grupo de afinidad (péptido, anticuerpo y/o dominio de anticuerpo), se fusionan para formar un constructo molecular biespecífico mediante el uso de las técnicas estándar de ADN recombinante, tal como PCR de ensamblaje o síntesis directa de genes, luego la proteína de fusión se expresa en un huésped adecuado. Los constructos biespecíficos también se generan mediante la conjugación química de dos grupos individuales en cualquier combinación que se considere adecuada para la unión biespecífica (péptido-péptido, fragmento de péptido-anticuerpo, etc.). Se usan dos dominios de anticuerpos para generar los anticuerpos biespecíficos mediante el uso de diversas arquitecturas de última generación (1). Además, se usa un andamio polimérico sintético (PEG, PPG u otro) para generar enlaces estables entre cada grupo de unión y mejorar la flexibilidad del constructo. Los polímeros

ramificados también se usan para aumentar la afinidad de unión al eritrocito, al antígeno proteico, o a ambos, por los efectos de avidéz.

- 5 La caracterización de la eficacia de unión del constructo biespecífico se realiza mediante el uso de ensayos bioquímicos estándar de afinidad de la unión in vitro, tales como ELISA y resonancia de plasmones superficiales. El rendimiento in vivo del constructo biespecífico se realiza por inyección del constructo biespecífico, o el constructo biespecífico y el antígeno, en un modelo animal como ratones o ratas, luego se toman muestras de sangre y se analiza la unión a los eritrocitos y al antígeno mediante el uso de ensayos in vitro similares.
- 10 Las modalidades incluyen una composición farmacéuticamente aceptable que comprende: un grupo de unión a los eritrocitos unido a un dominio que se une específicamente a una diana. La diana puede comprender una proteína, y la proteína además comprende un antígeno tolerogénico. El grupo de unión a los eritrocitos comprende un ligando peptídico. El dominio puede elegirse del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y un dominio de unión al antígeno de cadena sencilla (scFv), un ligando peptídico y un aptámero. Una modalidad es una composición que
- 15 comprende un miembro del grupo que se elige de una fusión molecular, un scFv en tándem, un díacuerpo y una molécula de scFv-IgG en tándem, con el grupo de unión a los eritrocitos y el dominio que forma parte de dicho miembro. Una única proteína de fusión, o ácido nucleico que la codifica, puede comprender el dominio de unión a los eritrocitos y el otro dominio que se une a la diana.
- 20 Reducción terapéutica de los anticuerpos específicos al antígeno mediante el uso de los antígenos de unión a los eritrocitos
- 25 La inducción de anticuerpos específicos al antígeno es perjudicial para el tratamiento y puede causar efectos secundarios peligrosos durante las terapias de reemplazo de proteínas, en la patogénesis de la autoinmunidad y durante el tratamiento con componentes biológicos en general (63-68). Las intervenciones terapéuticas capaces de reducir los anticuerpos específicos al antígeno circulante en la sangre tendrían un impacto clínico positivo, ya que la reducción de dichos anticuerpos específicos al fármaco permitiría el tratamiento futuro con el fármaco mientras que disminuye el riesgo de efectos secundarios inmunológicos adversos debido a los complejos fármaco-anticuerpo. En el caso del ejemplo de la hemofilia A, aproximadamente el 30 % de los pacientes inducen anticuerpos antifármacos hacia el fármaco estándar
- 30 terapéutico proteico, el Factor VIII, lo que hace que el tratamiento posterior con el Factor VIII sea peligroso e ineficaz. Una intervención terapéutica que reduce los anticuerpos circulantes específicos al Factor VIII en dicho paciente vuelve a habilitar el tratamiento terapéutico con el Factor VIII y elimina la necesidad de cambiar al paciente a otras alternativas de tratamiento más costosas y menos efectivas. En el caso del ejemplo del lupus eritematoso sistémico (LES, lupus), una enfermedad autoinmunitaria mediada principalmente por la inducción de anticuerpos contra autoantígenos nativos en el
- 35 cuerpo, un tratamiento terapéutico capaz de reducir los anticuerpos específicos al autoantígeno que circulan en la sangre sería disminuir en gran medida la patogénesis y la progresión de la aparición de la enfermedad.
- 40 Para reducir los anticuerpos específicos al antígeno, los antígenos se diseñan para unirse a los eritrocitos circulantes después de la administración. Los constructos moleculares de un grupo de unión a los eritrocitos fusionado con el antígeno de interés se generan para formar el antígeno de unión a los eritrocitos. Alternativamente, puede implementarse un constructo biespecífico para generar una formulación de unión a los eritrocitos del antígeno, como se describió anteriormente. De esta manera, tras la inyección del antígeno de unión a los eritrocitos, cualquier anticuerpo circulante específico para el antígeno se unirá al antígeno diseñado y, por lo tanto, se asociará estrechamente con un eritrocito circulante in situ. Durante la estrecha asociación física de un anticuerpo específico al antígeno con una célula que circula
- 45 de forma natural, como el eritrocito, las señales reguladoras presentes en el eritrocito inhiben los peligrosos efectos inmunitarios inflamatorios. Los eritrocitos expresan varias moléculas reguladoras en su superficie, incluidas CD55 y CD59, entre otras (67). Por lo tanto, los anticuerpos específicos al antígeno permanecen unidos a los eritrocitos y se trasladan a zonas de eliminación natural de los eritrocitos, durante los cuales también se eliminan. El eritrocito decorado con el antígeno sirve como un depósito de seguridad celular y un portador de reducción para el anticuerpo específico al antígeno.
- 50 La reducción de los anticuerpos específicos al antígeno se caracteriza después de la administración in vivo del constructo diseñado del antígeno, mediante el muestreo periódico de la sangre de los animales de prueba y la realización de técnicas de titulación del anticuerpo específico al antígeno, tales como ELISA. La eliminación o la inactivación específica de la célula inmunitaria secretora de anticuerpos (célula B, célula plasmática u otra) también se caracteriza por el aislamiento de las células inmunitarias de la sangre, la médula ósea, el bazo o el sistema linfático de los ratones receptores y la
- 55 realización de ensayos ELISpots de reestimulación de células B específicas al antígeno in vitro y la citometría de flujo multiparamétrica. En estudios relacionados con la autoinmunidad, se usan modelos relevantes de ratón de trastornos autoinmunitarios para caracterizar los efectos de los antígenos de unión a los eritrocitos en la reducción del autoantígeno.
- 60 Los usos de las composiciones incluyen eliminar los anticuerpos de la circulación y/o unirlos a los glóbulos rojos. Una modalidad es una composición farmacéuticamente aceptable que comprende: un grupo de unión a los eritrocitos unido a un antígeno. El antígeno puede ser un autoantígeno nativo, por ejemplo, un antígeno de lupus eritematoso. El antígeno puede ser alternativamente un antígeno para una proteína terapéutica que se administra a un paciente, por ejemplo, un antígeno del Factor VIII.
- 65 Aptámeros para la unión específica de los eritrocitos

Además de los ligandos peptídicos que se unen a los eritrocitos, se describen ligandos de aptámeros de nucleótidos para los componentes de la superficie de los eritrocitos. Por consiguiente, los aptámeros se fabricarán y usarán como se describe en la presente descripción para otros grupos de unión a los eritrocitos. Los aptámeros de ADN y ARN pueden usarse para proporcionar la unión no covalente a los eritrocitos. Dado que solo se componen de nucleótidos, los aptámeros son grupos prometedores de orientación biomolecular en que las metodologías de selección están bien establecidas, se sintetizan químicamente de manera fácil y presentan una inmunogenicidad y/o toxicidad de efectos secundarios limitados debido a su rápida eliminación in vivo (Keefe, Pai, y otros, 2010). Además, debido a la naturaleza no canónica de la interacción nucleótido-proteína diana, es poco probable cualquier señalización productiva del agonista tras la unión a la diana in vivo, lo que contribuye a una baja inmunogenicidad y toxicidad. Como tal, numerosas moléculas basadas en aptámeros se encuentran actualmente en ensayos clínicos en humanos para una serie de indicaciones clínicas, que incluyen leucemia, degeneración macular, trombosis y diabetes tipo 2 (Keefe, Pai, y otros, 2010). Los aptámeros también se han usado como agentes de orientación para administrar las cargas de fármacos a los tejidos específicos in vivo, en aplicaciones como la quimioterapia contra el cáncer y las técnicas de fluorescencia o detección radiológica de tumores (Rockey, Huang, y otros, 2011; Savla, Taratula, y otros, 2011).

Los aptámeros son ácidos oligonucleicos o péptidos que se unen a una molécula diana específica. Los aptámeros generalmente se generan para unirse a una diana de interés al seleccionarlos de un gran grupo de secuencias aleatorias. Los aptámeros pueden clasificarse como aptámeros de ADN, aptámeros de ARN o aptámeros peptídicos. Los aptámeros de ácido nucleico son especies de ácido nucleico que se han diseñado mediante rondas repetidas de selección in vitro o por el método de evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX) (Archemix, Cambridge, MA, Estados Unidos) (Sampson, 2003) para unirse específicamente a dianas tales como moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos, células, tejidos y organismos. Los aptámeros peptídicos tienen típicamente un dominio peptídico variable corto, unido en ambos extremos a un andamio proteico. Los aptámeros peptídicos son proteínas que se diseñan para interferir con otras interacciones proteicas dentro de las células. Consisten en un bucle peptídico variable unido en ambos extremos a un andamio proteico. Esta restricción estructural doble aumenta en gran medida la afinidad de unión del aptámero peptídico para ser comparable a un anticuerpo. La longitud del bucle variable se compone típicamente de aproximadamente diez a aproximadamente veinte aminoácidos, y el andamio es una proteína que tiene buena solubilidad y es compacta. Por ejemplo, la proteína bacteriana tioredoxina-A es una proteína de andamio, con el bucle variable insertado dentro del sitio activo reductor, que es un bucle -Cys-Gly-Pro-Cys- en la proteína salvaje, las dos cadenas laterales de cisteína pueden formar un puente disulfuro.

Algunas técnicas para fabricar aptámeros se detallan en Lu y otros, Chem Rev 2009: 109(5): 1948-1998, y también en los documentos US 7,892,734, US 7,811,809, US 2010/0129820, US 2009/0149656, US 2006/0127929, y US 2007/0111222. El Ejemplo 8 detalla más materiales y métodos para la fabricación y el uso de los aptámeros.

#### Fusión molecular

Puede formarse una fusión molecular entre un primer ligando peptídico de unión a los eritrocitos y un segundo péptido. La fusión comprende los péptidos conjugados directa o indirectamente entre sí. Los péptidos pueden conjugarse directamente entre sí o indirectamente a través de un conector. El conector puede ser un péptido, un polímero, un aptámero, un ácido nucleico o una partícula. La partícula puede ser, por ejemplo, una micropartícula, una nanopartícula, un polimerosoma, un liposoma o una micela. El polímero puede ser, por ejemplo, natural, sintético, lineal o ramificado. Una proteína de fusión que comprende el primer péptido y el segundo péptido es un ejemplo de una fusión molecular de los péptidos, con la proteína de fusión que comprende los péptidos directamente unidos entre sí o con secuencias conectoras intermedias y/o secuencias adicionales en uno o ambos extremos. La conjugación con el conector puede ser a través de enlaces covalentes. Otros enlaces incluyen enlaces iónicos. Los métodos incluyen la preparación de una fusión molecular o una composición que comprende la fusión molecular, en donde la fusión molecular comprende péptidos que se unen específicamente a los eritrocitos y a un agente terapéutico, antígeno tolerizante u otra sustancia.

El término fusión molecular, o el término conjugado, se refiere a la asociación directa o indirecta por enlaces químicos, incluidos covalente, iónico electrostático, carga-carga. La conjugación genera una unidad sostenida por enlaces químicos. La conjugación directa se refiere a la unión química al agente, con o sin conectores intermedios o grupos químicos. La conjugación indirecta se refiere al enlace químico con un portador. El portador puede encapsular en gran medida al agente, por ejemplo, un polimerosoma, un liposoma o micela o algunos tipos de nanopartículas, o tener el agente en su superficie, por ejemplo, una perla o nanopartícula metálica, o ambos, por ejemplo, una partícula que incluye algunos agentes tanto en su interior como en su exterior. El portador también puede encapsular un antígeno para la inmunotolerancia. Por ejemplo, puede fabricarse un polimerosoma, liposoma o una partícula que encapsule el antígeno. El término encapsular significa cubrir completamente, de manera efectiva sin que se exponga ninguna parte, por ejemplo, puede fabricarse un polimerosoma que encapsule un antígeno o un agente. Los ejemplos de agentes terapéuticos son fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), fragmentos de anticuerpos, carga de moléculas pequeñas, péptidos bioactivos, proteínas bioactivas y biomoléculas bioactivas.

La conjugación puede lograrse mediante la unión covalente del péptido a otra molécula, con o sin el uso de un conector. La formación de tales conjugados está dentro de la habilidad de los expertos y se conocen diversas técnicas para lograr la conjugación, y la elección de la técnica particular se guía por los materiales a conjugar. La adición de aminoácidos al polipéptido (C- o N-terminal) que contienen cadenas laterales ionizables, es decir, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina,

arginina, cisteína, histidina o tirosina, y no se incluyen en la parte activa de la secuencia del polipéptido, sirven en su estado no protonado como un nucleófilo potente para participar en diversas reacciones de bioconjugación con grupos reactivos unidos a polímeros, es decir, PEG homobifuncional o heterobifuncional (por ejemplo, Lutolf y Hubbell, *Biomacromolecules* 2003; 4:713-22, Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, London. Academic Press Ltd; 1996). En algunas modalidades, se usa un conector de polímero soluble, y puede administrarse a un paciente en una forma farmacéuticamente aceptable. O un fármaco puede encapsularse en polimerosomas o vesículas o unirse covalentemente al ligando peptídico.

Una modalidad es una conjugación de un agente terapéutico no proteico y un ligando peptídico que se une específicamente a un eritrocito. La aplicación de la metodología del péptido de unión a los eritrocitos no se limita a terapéuticos de polipéptidos; más bien se puede traducir a otras formulaciones de fármacos, tales como moléculas pequeñas y partículas poliméricas. En la larga historia de las moléculas pequeñas y su aplicación en la medicina, las vidas medias de circulación corta y la escasa biodisponibilidad han afectado constantemente su eficacia in vivo. Las nanopartículas y las micelas poliméricas representan una generación relativamente nueva de la clase de fármacos, pero su comportamiento farmacocinético sigue siendo subóptimo por razones que incluyen una alta tasa de eliminación a través de la acción del sistema reticuloendotelial (Moghimi y Szabeni, 2003). El diseño de unión a los eritrocitos puede extenderse a estas otras clases de fármacos para aumentar su vida media en circulación y su eficacia clínica.

El conjugado puede comprender una partícula. El péptido de unión a los eritrocitos puede unirse a la partícula. Un antígeno, agente u otra sustancia puede estar dentro o sobre la partícula. Los ejemplos de las nanopartículas, las micelas y otras partículas se encuentran en, por ejemplo, los documentos US 2008/0031899, US 2010/0055189, US 2010/0003338, cuyas solicitudes se incorporan por la presente descripción por referencia en la presente descripción para todos los fines, incluida la combinación de las mismas con un ligando como se establece en la presente descripción; en caso de conflicto, sin embargo, la especificación instantánea controla.

Las nanopartículas pueden prepararse como colecciones de partículas que tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 200 nm, incluidos todos los intervalos y los valores entre los límites explícitamente expuestos, por ejemplo, de aproximadamente 20 a aproximadamente 200, y de aproximadamente 20 a aproximadamente 40, hasta aproximadamente 70, o hasta aproximadamente 100 nm, dependiendo de la polidispersidad que se obtiene mediante el método preparativo. Pueden usarse varios sistemas de nanopartículas, tales como las formadas a partir de copolímeros de poli(etilenglicol) y poli(ácido láctico), las formadas a partir de copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(éster beta-amino) y las formadas a partir de proteínas, tales como la albúmina sérica. Los expertos en estas técnicas conocen otros sistemas de nanopartículas. Véase también Devalapally y otros, *Cancer Chemother Pharmacol.*, 07-25-06; Langer y otros, *International Journal of Pharmaceutics*, 257:169-180 (2003); and Tobío y otros, *Pharmaceutical Research*, 15(2):270-275 (1998).

También pueden prepararse partículas más grandes de más de aproximadamente 200 nm de diámetro promedio, que incorporan los ligandos de unión al tejido del cartílago, con estas partículas denominadas micropartículas en la presente descripción, ya que comienzan a acercarse a la escala de las micras y caen aproximadamente dentro del límite de la resolución óptica. Por ejemplo, ciertas técnicas para hacer micropartículas se exponen en las patentes de los Estados Unidos núms. 5,227,165, 6,022,564, 6,090,925, y 6,224,794.

La funcionalización de las nanopartículas para emplear la capacidad de orientación requiere la asociación del polipéptido dirigido con la partícula, por ejemplo, mediante unión covalente mediante el uso de una técnica de bioconjugación, con la elección de una técnica particular guiada por la partícula o la nanopartícula, u otro constructo, al que el polipéptido debe unirse. En general, muchas técnicas de bioconjugación para unir péptidos a otros materiales se conocen bien y puede elegirse la técnica más adecuada para un material en particular. Por ejemplo, pueden unirse aminoácidos adicionales a las secuencias de polipéptidos, como una cisteína en el caso de unir el polipéptido a moléculas reactivas con tiol.

Para generar una molécula multimérica capaz de mostrar múltiples moléculas bioactivas diferentes, se modificó químicamente un dendrímero de PEG de 8 brazos disponible comercialmente para incluir los grupos reactivos para las reacciones de conjugación fáciles. El PEG-piridildisulfuro de 8 brazos contenía el grupo piridildisulfuro que reacciona fácilmente con los tiolatos de las moléculas pequeñas y/o los péptidos o proteínas que contienen cisteína, lo que resulta en un enlace disulfuro entre el grupo bioactivo unido y el andamio de PEG de 8 brazos. La arquitectura multimérica del PEG de 8 brazos permitió la conjugación de diferentes péptidos o moléculas al andamio, lo que generó así una biomolécula heterofuncionalizada con múltiples actividades en virtud de sus grupos unidos. Se generaron constructos de PEG de 8 brazos fluorescentes heterofuncionalizados, capaces de unirse a los eritrocitos in vitro (Figura 4A) e in vivo (Figura 4B). Esta unión fue específica al péptido ERY1, ya que los conjugados que albergan el péptido MIS no específico demostraron poca o ninguna unión a los eritrocitos. La unión in vivo fue de larga duración, ya que se detectó PEG-ERY1-ALEXAFLUOR647 de 8 brazos fluorescente en los eritrocitos circulantes 5 h después de la administración intravenosa, y mostró una vida media en la superficie celular de 2,2 h (Figura 5). Para demostrar la inducción de tolerancia en un modelo de ratón diabético autoinmunitario, se generó un conjugado de PEG de 8 brazos con ERY1 y el antígeno de diabetes cromogranina-A (CrA). La naturaleza modular del andamio de PEG-piridildisulfuro de 8 brazos permitió conjugar conjuntamente diferentes moléculas que contienen tiol mediante la adición secuencial de cantidades definidas estequiométricamente de las moléculas.

La fusión molecular puede comprender un polímero. El polímero puede ser lineal o ramificado. La fusión molecular puede comprender un dendrímero. En general, pueden usarse polímeros biocompatibles hidrofílicos solubles para que el conjugado sea soluble y esté biodisponible después de la introducción en el paciente. Los ejemplos de polímeros solubles son los alcoholes polivinílicos, las polietileniminas y los polietilenglicoles (un término que incluye óxidos de polietileno) que tienen un peso molecular de al menos 100, 400 o entre 100 y 400 000 (con todos los intervalos y los valores contemplados entre estos valores explícitos). La solubilidad en este contexto se refiere a una solubilidad en agua o solución salina fisiológica de al menos 1 gramo por litro. También pueden usarse dominios de polímeros biodegradables, por ejemplo, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico y poliglicólico, policaprolactonas, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos y policianoacilos.

En algunas modalidades, se prepara una asociación polipéptido-polímero, por ejemplo, un conjugado, y se introduce en el cuerpo como una composición purificada en una condición farmacéuticamente aceptable, o con un excipiente farmacéutico. El sitio de introducción puede ser, por ejemplo, sistémico, o en un sitio de tejido o trasplante.

Los expertos pueden preparar proteínas de fusión mediante el uso de técnicas conocidas en estas materias. Las modalidades incluyen preparar las proteínas de fusión, aislarlas y administrarlas en una forma farmacéuticamente aceptable con o sin otros agentes, por ejemplo, en combinación con una interleucina de TGF-beta. Las modalidades incluyen un vector para, y métodos de, transfectar una célula para así diseñar la célula para que produzca la proteína de fusión in vivo, con la célula siendo transfectada in vitro, ex vivo o in vivo, y siendo la célula miembro de un implante de tejido o distinto de este. Las siguientes solicitudes de patentes de los Estados Unidos se incorporan por la presente descripción como referencia en la presente descripción para todos los fines, incluidos los fines de hacer proteínas de fusión, con la especificación instantánea que controla en caso de conflicto: 5227293, 5358857, 5885808, 5948639, 5994104, 6512103, 6562347, 6905688, 7175988, 7704943, US 2002/0004037, US 2005/0053579, US 2005/0203022, US 2005/0250936, US 2009/0324538.

Las modalidades de una fusión molecular incluyen, por ejemplo, una fusión molecular que comprende un antígeno tolerogénico y un grupo de unión a los eritrocitos que se une específicamente a un eritrocito en el paciente y, por lo tanto, une el antígeno al eritrocito, en donde la fusión molecular se administra en una cantidad eficaz para producir inmunotolerancia a una sustancia que comprende el antígeno tolerogénico. Las modalidades incluyen, por ejemplo, una composición que comprende un grupo de unión a los eritrocitos que se une específicamente a un eritrocito unido a un portador que se elige del grupo que consiste en un polímero, un polímero ramificado y una partícula, en donde el vehículo se une a un agente terapéutico. La partícula puede ser, por ejemplo, una micropartícula, una nanopartícula, un polimerosoma, un liposoma o una micela. El grupo de unión a los eritrocitos comprende un péptido que comprende al menos 5 residuos de aminoácidos consecutivos de una secuencia que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, y las sustituciones conservadoras de estos, en donde dicha secuencia se une específicamente a un eritrocito.

En un ejemplo, se describe una fusión molecular que comprende un antígeno tolerogénico y un grupo de unión a los eritrocitos que se selecciona de banda 3 (CD233), glicoforina B (CD235b), glicoforina C (CD235c) y glicoforina D (CD235d). La fusión molecular es particularmente para el uso en la producción de inmunotolerancia. Una fusión molecular ejemplar es aquella que comprende un antígeno tolerogénico que se selecciona de: una proteína, una parte de una proteína, una proteína humana o una parte de esta, una proteína no humana o una parte de esta, un glicano, un glicano de una proteína que comprende glicosilación no humana, un antígeno autoinmunitario humano, una proteína terapéutica para un humano o una parte de esta, y una parte de un alimento humano, proteínas deficientes por enfermedad genética, proteínas con glicosilación no humana, proteínas no humanas, proteínas sintéticas que no se encuentran de forma natural en humanos, antígenos alimentarios humanos, antígenos de trasplante humano y antígenos autoinmunitarios humanos; y un grupo de unión a los eritrocitos que se selecciona de banda 3 (CD233), glicoforina B (CD235b), glicoforina C (CD235c), glicoforina D (CD235d).

Ligandos de unión a los eritrocitos para una farmacocinética mejorada

Como muchos fármacos se administran de manera sistémica al sistema circulatorio de la sangre, la respuesta al problema de la administración efectiva del fármaco a menudo se centra en mantener el fármaco en la sangre durante períodos prolongados de tiempo. Por lo tanto, el desarrollo de terapéuticos de circulación larga (vida media larga) que permanecen biológicamente disponibles en la sangre durante períodos prolongados representará una nueva generación de fármacos diseñados para la eficacia, la seguridad y la viabilidad económica.

Las modalidades de la invención incluyen las fusiones moleculares de un péptido de unión a los eritrocitos y un agente terapéutico. Las fusiones moleculares entre los péptidos que se unen específicamente a los eritrocitos y un agente terapéutico u otra sustancia proporcionan un mayor tiempo de circulación (vida media circulante en sangre in vivo) para el agente/sustancia. El aumento puede ser, por ejemplo, un aumento de aproximadamente 1,5 veces a 20 veces de la vida media en suero, los expertos apreciarán de inmediato que se contemplan todos los intervalos y los valores dentro de los intervalos explícitamente establecidos, por ejemplo, aproximadamente 3 veces o aproximadamente 6 veces o entre aproximadamente 3 veces y aproximadamente 6 veces.

Las fusiones moleculares pueden lograrse mediante, por ejemplo, la adición recombinante del péptido o la adición del péptido mediante conjugación química a un sitio reactivo en el agente terapéutico o la molécula o la partícula asociada. Como la síntesis de péptidos en fase sólida puede usarse para sintetizar altos rendimientos de péptidos puros con grupos reactivos terminales variables, existen múltiples estrategias de conjugación para la unión del péptido al terapéutico. Aunque este método de funcionalización difiere del método recombinante usado con las proteínas, se postula que el efecto (la unión de los eritrocitos que conduce a una vida media de circulación aumentada) es el mismo.

Una modalidad de la invención implica la funcionalización de los agentes terapéuticos con los ligandos peptídicos cortos que se unen específicamente a los eritrocitos como herramientas para la mejora de los parámetros farmacocinéticos de los agentes terapéuticos. Esta metodología de la extensión de la vida media tiene en cuenta parámetros fundamentales en el diseño de los fármacos terapéuticos, concretamente, la simplicidad en la fabricación, la modularidad y la capacidad de ajustar el efecto de extensión. Mediante el uso de las técnicas estándar de ADN recombinante, las proteínas se alteran fácilmente a nivel de aminoácidos para contener funcionalidades nuevas o alteradas. En general, es preferible confiar en el uso de los dominios peptídicos más cortos para la función que usar los dominios polipeptídicos más grandes, por razones que incluyen la facilidad de la fabricación, el plegamiento correcto en una proteína terapéutica funcional y las mínimas alteraciones biofísicas del propio terapéutico original. Los polipéptidos, por ejemplo, ERY1, un ligando de unión a los eritrocitos humanos, o los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos, pueden diseñarse para unirse específicamente a los eritrocitos y conjugarse con un agente terapéutico para extender la biodisponibilidad, por ejemplo, medido por la vida media circulante del agente.

Los resultados informados en la presente descripción brindan oportunidades para realizar las fusiones moleculares para mejorar los parámetros farmacocinéticos de los agentes terapéuticos tales como insulina, acetato de pramlintida, hormona del crecimiento, factor de crecimiento similar a la insulina 1, eritropoyetina, interferón alfa tipo 1, interferón  $\alpha 2a$ , interferón  $\alpha 2b$ , interferón  $\beta 1a$ , interferón  $\beta 1b$ , interferón  $\gamma 1b$ ,  $\beta$ -glucocerebrosidasa, adenosina desaminasa, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, interleucina 1, interleucina 2, interleucina 11, factor VIIa, factor VIII, factor IX, exenatida, L-asparaginasa, rasburicasa, receptor del factor de necrosis tumoral y enfuvirtida.

Los intentos de otros para generar métodos pasivos de mejora de la vida media se centran en aumentar el radio hidrodinámico aparente del fármaco. El aparato de filtración glomerular del riñón es el sitio primario del cuerpo donde se filtran los componentes sanguíneos. El principal determinante de la filtración es el radio hidrodinámico de la molécula en la sangre; las moléculas más pequeñas (<80 kDa) se filtran de la sangre en mayor medida que las moléculas más grandes. Los investigadores han usado esta regla generalizada para modificar los fármacos para exhibir un radio hidrodinámico más grande y, por lo tanto, una vida media más larga, principalmente a través de la conjugación química con polímeros solubles en agua de gran peso molecular, como el polietilenglicol (PEG). El éxito de este método es evidente en las numerosas terapias de proteínas PEGiladas y moléculas pequeñas terapéuticas que se ofrecen actualmente en la clínica (Pasut y Veronese, 2009; Fishburn, 2008). Aunque son efectivos en muchos casos para aumentar la vida media de circulación, especialmente a medida que aumenta el radio hidrodinámico del injerto o la fusión (Gao, Liu, y otros, 2009), estos métodos ofrecen desafíos en la fabricación y el mantenimiento de la función efectora biológica. Las heterogeneidades en las reacciones de conjugación pueden causar mezclas complejas de productos con diversas actividades biológicas, debido principalmente al uso de productos químicos sitio-inespecíficos. La caracterización bioquímica extensa a menudo sigue métodos de purificación precisos para retener un producto terapéutico homogéneo (Huang, Gough, y otros, 2009; Bailon, Palleroni, y otros, 2001; Dhalluin, Ross, y otros, 2005). Además, la unión de grupos grandes, tales como los PEG ramificados, a zonas reactivas de las proteínas puede conducir a una disminución de la afinidad del receptor (Fishburn, 2008).

Otros trabajos de otros han proporcionado una proteína terapéutica para unirse a la albúmina para aumentar la circulación del fármaco (Dennis, 2002; Walker, Dunlevy, y otros, 2010). Teniendo en cuenta la misma regla general antes mencionada sobre la filtración renal, Dennis y sus colegas plantearon la hipótesis de que aumentar el tamaño aparente del terapéutico mediante la ingeniería para que se una a otra proteína en la sangre (como la albúmina sérica) disminuiría la tasa de eliminación del fármaco. De esta manera, el fármaco alcanza su gran tamaño molecular solo después de la administración en el torrente sanguíneo. La adición de péptidos de unión a la albúmina de suero madurados por afinidad a los fragmentos de anticuerpos aumentó su tiempo de circulación 24 veces en ratones (Dennis, 2002). Aunque efectivo, este método es complicado por la dinámica del reciclaje de la albúmina por el receptor Fc neonatal (FcRn) y el uso de péptidos cíclicos con restricción de cisteína para la funcionalidad. Walker y sus colegas corroboran los resultados aportados por Dennis en 2002, concretamente que impartir a una proteína afinidad por la albúmina sérica aumenta su vida media. El método descrito por Walker y sus colegas implica la adición recombinante de grandes fragmentos de anticuerpos al fármaco proteico, lo que puede causar complicaciones estructurales y de fabricación. Aunque elegantes y efectivos, los métodos de Dennis y Walker son complicados por el uso de dominios complejos cíclicos o grandes para la funcionalidad. Aunque los péptidos descubiertos por Dennis y sus colegas mostraron una alta afinidad por la albúmina, requieren la restricción física de formar correctamente una estructura cíclica antes de su uso. Un enfoque más voluminoso, el método de Walker de fusionar fragmentos de anticuerpos más grandes puede no ser adaptable a proteínas con una estructura de plegamiento ya compleja o de bajo rendimiento de expresión.

Anticuerpos de cadena sencilla

Una modalidad de la invención es una fusión molecular de un scFv con un péptido que se une específicamente a un eritrocito. Puede usarse un scFv como agente terapéutico, y su combinación con un péptido de unión a los eritrocitos puede usarse para extender su vida media circulante y proporcionar acceso a los compartimentos del cuerpo. Los anticuerpos recombinantes y los fragmentos de anticuerpos recombinantes tienen potencial como terapéuticos en la industria biológica (Sheridan, 2010).

Los fragmentos de anticuerpo de fragmento variable de cadena sencilla (scFv) comprenden todo el dominio de unión al antígeno de una IgG de longitud completa, pero carecen de las regiones del fragmento constante y la bisagra (Maynard y Georgiou, 2000). La construcción recombinante de un scFv implica fusionar el dominio variable pesado (VH) con el dominio variable ligero (VL) con un conector polipeptídico corto que consiste en repeticiones en tándem de glicina y serina (por ejemplo, (GGGGS)<sub>4</sub>) (SEQ ID NO: 18). Aunque la simplicidad de scFv es atractiva para las aplicaciones terapéuticas, su principal inconveniente es que exhibe una vida media de circulación corta, en virtud de su peso molecular relativamente pequeño de 26 - 28 kDa (Weisser y Hall, 2009).

Como el conector de glicina-serina comúnmente usado en el diseño de scFv no es de naturaleza funcional, más bien existe como un puente físico para asegurar el correcto plegamiento de VH-VL, en la presente descripción se probaron los dominios del conector que exhiben una función de unión a los eritrocitos en la sangre. Por lo tanto, el scFv diseñado puede ser multifuncional y biespecífico, que muestra una afinidad con su antígeno nativo a través de los dominios V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>, y una afinidad por los eritrocitos en su dominio conector. Al unirse a los eritrocitos, el scFv diseñado exhibirá una vida media de circulación más larga, como se ha demostrado para otra proteína modelo con esta misma funcionalidad. Un fragmento de anticuerpo scFv puede tener un conector como se describe en la presente descripción, o pueden proporcionarse otros conectores como conocen los expertos en estas técnicas. Una modalidad alternativa proporciona un grupo de cisteína libre diseñado en la región del conector de un scFv, y este tiol de cisteína se usa para unir mediante conjugación química un ligando de unión a los eritrocitos.

El diseño de los anticuerpos scFv diseñados se centró en la importancia de la longitud del dominio conector, así como en el espaciamiento del péptido de unión a los eritrocitos. Como la variante de tipo salvaje se diseñó y se validó para la unión al antígeno con un conector (GGGGS)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 18), los mutantes posteriores se diseñaron con una longitud mínima del conector de 20 aminoácidos. Como el dominio conector puede modular el plegamiento correcto del scFv en su estructura terciaria correcta, se diseñaron dos mutantes que contienen ERY1. El mutante REP contiene el péptido ERY1 centrado en el dominio conector, flanqueado por el número correcto de residuos de Gly y Ser para mantener la longitud del conector original de 20 aminoácidos. En el caso posible de que la naturaleza hidrofóbica del péptido ERY1 no se alinee linealmente, sino que se agrupe en un dominio ensamblado más corto, la longitud del conector de REP sería más corta y podría obstaculizar el plegamiento correcto. Por tales razones, el mutante INS se diseñó para contener el péptido ERY1 incorporado en el centro del dominio del conector original, alargando el conector hasta 32 aminoácidos. Como el péptido ERY1 se descubrió con un N-terminal libre, no se sabía si su presencia en una conformación de polipéptidos limitada afectaría o no a la unión a los eritrocitos. Para abordar este comportamiento potencial, se creó una variante de scFv mediante la conjugación química con el péptido ERY1 sintético, por lo que el N-terminal del péptido está libre y el C-terminal se conjuga con el scFv.

De esta manera, el número de péptidos de unión a los eritrocitos, y por lo tanto la capacidad de unión a los eritrocitos de un scFv, puede ajustarse estequiométricamente durante la reacción de conjugación. De acuerdo con esto, scFv puede diseñarse para comprender los péptidos de unión a los eritrocitos como se enseña en la presente descripción. Las modalidades incluyen un scFv que comprende varios ligandos que varían de 1 a 20; los expertos apreciarán de inmediato que se contemplan todos los intervalos y los valores dentro de los intervalos explícitamente establecidos, por ejemplo, entre 2 y 6.

Las modalidades incluyen el scFv conjugado con un antígeno tolerogénico para hacer una fusión molecular que induce tolerancia, por ejemplo, como en el Ejemplo 6 que describe los detalles para generar tolerancia como se ejemplifica con la generación de tolerancia contra OVA que se une a un scFv. El Ejemplo 6 también detalla los materiales y los métodos para fabricar de forma recombinante constructos de proteínas scFv fusionadas a un epítipo de reconocimiento inmunitario de un antígeno. El scFv se dirige al reconocimiento de los eritrocitos. El antígeno es un antígeno como se describe en la presente descripción, por ejemplo, un antígeno tolerogénico. Los ejemplos de trabajo reportados en la presente descripción describen los resultados mediante el uso de modelos murinos, con el uso de scFv TER119 murino usado como el dominio de anticuerpo en los constructos. TER119 es un anticuerpo que se une a los eritrocitos de ratón. El dominio del anticuerpo TER119 puede reemplazarse por otros dominios de anticuerpos, por ejemplo dominios dirigidos a un eritrocito en humanos u otros animales. Por ejemplo, el dominio de anticuerpo 10F7 puede usarse para generar constructos de anticuerpo-antígeno capaces de unirse a los eritrocitos humanos. Se realizaron fusiones adicionales de scFv de Ter-119 con tres antígenos diferentes, como se informa en el Ejemplo 6, incluido el epítipo inmunodominante MHC-I de OVA, el mimotopo de cromogranina-A 1040-p31 y la proinsulina.

El Ejemplo 13 describe otras modalidades de scFv que se han realizado, incluidas las modalidades para probar en modelos animales y las modalidades reactivas para humanos. Estas incluyen las relacionadas con el nivel de proteína: TER119-SIINFEKL, TER119-ChrA, y TER119-proinsulina. Estos también incluyen las relacionadas con el nivel genético: TER119-SIINFEKL, TER119-ChrA, TER119-proinsulina, TER119-uricasa, TER119-InsB9-23, TER119-

ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 80), TER119-H-2kb, TER119-H-2kd, 10F7-SIINFEKL, 10F7-ChrA, 10F7-proinsulina, y 10F7-uricasa.

Unión de los eritrocitos a sitios particulares, como la vasculatura tumoral

5 Además de aumentar la vida media de un fármaco, la capacidad de un terapéutico diseñado para unirse a los eritrocitos es útil para unir selectivamente y localizar los eritrocitos en un sitio particular del cuerpo. En el tratamiento de tumores sólidos, puede usarse la quimioembolización transarterial (TACE) para limitar el suministro de sangre al tumor, lo que dificulta su acceso a los nutrientes necesarios para el crecimiento. El tratamiento con TACE implica la inserción quirúrgica de micropartículas sólidas poliméricas en el sentido del suministro de sangre al tumor. A medida que las micropartículas alcanzan el lecho vascular del tumor, quedan atrapadas físicamente en la red de vasos sanguíneos, generando así un bloqueo para el suministro de sangre al tumor (Vogl, Naguib, y otros, 2009).

15 De acuerdo con el tema TACE, una modalidad en la presente descripción es usar eritrocitos autólogos que circulan en la sangre como micropartículas naturales para la embolización de los tumores mediante el diseño de un terapéutico de migración al tumor para contener un péptido de unión a los eritrocitos. De esta manera, el terapéutico se localiza en el lecho vascular del tumor y recluta a los eritrocitos que pasan para unirse al vaso, limitando y bloqueando así el flujo sanguíneo a la masa tumoral. Tal tratamiento es menos invasivo que el TACE clásico: el fármaco simplemente se inyectaría por vía intravenosa y usaría los eritrocitos naturales ya presentes en la sangre como partícula de embolización. El término unión al tumor o migración al tumor se refiere a un péptido que se une a un componente accesible desde el compartimento sanguíneo en la vasculatura tumoral o en las células tumorales.

25 El descubrimiento de terapéuticos específicos para la migración al tumor se conoce en el campo de la investigación del cáncer. El paradigma de la orientación bioactiva de los tumores se basa en la unión a marcadores de proteínas expresados específicamente en el entorno del tumor. Estos incluyen, pero no se limitan a: Integrinas dirigidas a RGD, aminopeptidasa-A y -N, endosialina, nucleolina de superficie celular, anexina-1 de superficie celular, receptor de p32/gC1q de superficie celular, plectina-1 de superficie celular, fibronectina EDA y EDB, receptor a de interleucina 11, tenascina-C, endogлина/CD105, BST-2, galectina-1, VCAM-1, fibrina y receptor de factor tisular. (Fonsatti, Nicolay, y otros, 2010; Dienst, Grunow, y otros, 2005; Ruoslahti, Bhatia, y otros, 2010; Thijssen, Postel, y otros, 2006; Schliemann, Roesli, y otros, 2010; Brack, Silacci, y otros, 2006; Rybak, Roesli, y otros, 2007). Un terapéutico dirigido a cualquiera de estas moléculas puede ser un vector para transportar un péptido de unión a los eritrocitos a la vasculatura tumoral para causar una oclusión específica.

35 Una modalidad es un primer ligando que se une específicamente a los eritrocitos conjugado con un segundo ligando que se une específicamente a una célula cancerosa o la vasculatura tumoral o un componente de la vasculatura tumoral, como una proteína en el subendotelio (que se expone parcialmente a la sangre en un tumor) o una proteína en la superficie de una célula endotelial tumoral. El ligando puede ser parte de una composición farmacéuticamente aceptable que se introduce en un paciente, por ejemplo, en el torrente sanguíneo. Los ligandos se unen a los eritrocitos y el ligando de migración al tumor se une a un sitio en o cerca del tumor o la vasculatura tumoral, o a una célula cancerosa. Los eritrocitos se acumulan en el sitio diana y bloquean el acceso del sitio diana a los nutrientes, por ejemplo, embolizando un vaso sanguíneo. Dado que la embolización es mecánica, y se determina por el tamaño físico del eritrocito, la embolización será repentina.

45 Los tumores sólidos dependen en gran medida de su suministro vascular, y se han desarrollado terapéuticos biomoleculares así como también materiales terapéuticos para bloquear el crecimiento de su suministro vascular o para bloquear el flujo a su suministro vascular. Una modalidad es una formulación biomolecular, o una formulación biomolecular de nanopartículas, que debe inyectarse sistémicamente para ocluir rápidamente la vasculatura de tumores sólidos, en el tumor primario o en las metástasis en ubicaciones conocidas o desconocidas.

50 La embolización tumoral se ha abordado de varias maneras, incluido el uso de partículas y métodos biomoleculares. Las partículas de biomaterial, incluidas las que se hacen de alcohol polivinílico, tienen un diámetro mayor que la microvasculatura tumoral, por ejemplo, 50-500 micrómetros de diámetro, y se han desarrollado para su uso clínico en la embolización arterial transcáteter o TACE (Maluccio, Covey, y otros, 2008). Un enfoque paralelo incluye quimioterapéuticos cargados dentro de las partículas para la liberación lenta en la quimioembolización transarterial (TACE), usadas principalmente para el tratamiento del carcinoma hepatocelular (Gadaleta y Ranieri, 2010). En ambos casos, cuando se inyectan las partículas en la circulación arterial, generalmente por un radiólogo intervencionista bajo la guía radiográfica, estas partículas pueden fluir hacia la vasculatura tumoral y ocluirla, bloqueando el flujo (Maluccio, Covey, y otros, 2008). Con estos enfoques locales, solo se trata el tumor que se dirige directamente mediante la colocación del catéter, y otros tumores, como las metástasis en lugares conocidos o desconocidos, no se tratan, ya que las partículas no pueden dirigirse fácilmente en los vasos. Más recientemente, se han explorado enfoques biomoleculares, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos biespecíficos que reconocen tanto un factor de trombosis como un marcador endotelial vascular tumoral que no está presente en la vasculatura normal. Después de unirse específicamente a la vasculatura tumoral, el anticuerpo se acumula e inicia la formación de coágulos sanguíneos dentro de los vasos tumorales para bloquearlos; este efecto solo se indujo cuando el anticuerpo se dirigió al tumor (Huang, Molema, y otros, 1997). Estos enfoques biomoleculares tienen el beneficio de dirigirse a tumores primarios y secundarios a partir de infusiones

intravenosas si puede identificarse las tipologías vasculares tumorales específicas; sin embargo, tienen la desventaja de no proporcionar una oclusión mecánica repentina al tumor.

Las modalidades de la invención incluyen un método para embolizar un tumor en un paciente que comprende la administración de una composición a un paciente que comprende un grupo de unión a los eritrocitos acoplado a un grupo dirigido, en donde el grupo dirigido es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o péptido que se dirige a una diana que se elige del grupo que consiste en un tumor y una microvasculatura tumoral, y en donde el grupo de unión a los eritrocitos comprende un péptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un aptámero que se une específicamente a los eritrocitos. El péptido puede ser, por ejemplo, una secuencia como se establece en la presente descripción.

#### Tolerancia inmunológica específica al antígeno

Además de mejorar el comportamiento farmacocinético de un agente terapéutico, se ha descubierto que la afinidad eritrocitaria puede usarse en métodos para generar tolerancia específica al antígeno. Ciertas modalidades de trabajo y proféticas se exponen en los Ejemplos. La tolerogénesis, como se demuestra en la presente descripción, puede dar como resultado la eliminación de los anticuerpos circulantes contra un antígeno, o la reducción de los anticuerpos circulantes contra un antígeno por un factor de al menos 10, es decir, al menos 100, al menos 1000 o más de 10 000. La tolerogénesis puede prevenir, curar o retrasar la progresión de la enfermedad, reducir o eliminar el rechazo de un tejido trasplantado y reducir o eliminar una reacción alérgica a una sustancia.

Los Ejemplos 3 y 10-12 detallan cómo se generó la tolerancia en modelos animales de ratón que predicen el comportamiento humano. El Ejemplo 3 mostró la generación de tolerancia mediante el uso de un antígeno de prueba (ovoalbúmina) conectado a un ligando peptídico que se une a una superficie de los eritrocitos. Los Ejemplos 10-12 corroboran los resultados del Ejemplo 3 y proporcionan ejemplos adicionales de trabajo que muestran la generación de tolerancia mediante el uso de ovoalbúmina unida a un scFv y asparaginasa unida a un ligando peptídico. En el Ejemplo 12 se proporciona un ejemplo de trabajo que muestra la generación de tolerancia que revierte el inmunorechazo preexistente. Por consiguiente, las modalidades incluyen una molécula de fusión para la tolerogénesis que comprende asparaginasa, un fragmento antigénico de asparaginasa, de un mimotopo antigénico de asparaginasa y un grupo de unión a los eritrocitos, con el grupo de unión a los eritrocitos que se une específicamente a, por ejemplo, glicoforina A o a una diana que se elige del grupo que consiste en banda 3, glicoforina B, glicoforina C u otros miembros del grupo diana de los eritrocitos. El grupo de unión a los eritrocitos se elige del grupo que consiste en ERY19', ERY59', ERY64', ERY123', ERY141', y ERY162' y las sustituciones conservadoras de estos. Estas moléculas de fusión pueden aplicarse profilácticamente antes de una primera administración de asparaginasa, durante un ciclo de tratamiento con asparaginasa y/o después de un ciclo de tratamiento con asparaginasa. Estas moléculas de fusión pueden aplicarse antes de que se observe una respuesta inmunitaria al fármaco de asparaginasa, o después de que se observe dicha respuesta.

En el Ejemplo 3, se descubrió un péptido que se une a los eritrocitos de ratón, ERY1. Se realizó una fusión molecular de ERY1 con un antígeno de prueba, la ovoalbúmina (OVA). La fusión se unió específicamente a los eritrocitos in vivo y no se unió a otras moléculas, incluidas las de la sangre o la vasculatura. Se observó una vida media circulante prolongada. Se observó que la unión de ERY1-OVA a los eritrocitos conduce a una presentación cruzada eficaz del epítipo inmunodominante MHC I de OVA (SIINFEKL) por las células presentadoras de antígeno (APC) y el cebado cruzado correspondiente de células T reactivas. ERY1-OVA indujo números mucho más altos de células T CD8<sup>+</sup> OT-I proliferantes de anexina-V<sup>+</sup> que OVA, lo que sugiere un destino apoptótico que eventualmente conduciría a la eliminación clonal. Mediante el uso de un modelo de tolerancia a la estimulación establecido de OT-I (Liu, Iyoda, y otros, 2002) (Figura 2), se demostró que ERY1-OVA previene las respuestas inmunitarias posteriores a la estimulación con el antígeno mediado por la vacuna, incluso con un adyuvante derivado de bacterias muy fuerte. La administración intravenosa de ERY1-OVA resultó en reducciones profundas en las poblaciones de células T CD8<sup>+</sup> OT-I en los ganglios linfáticos de drenaje (Figura 2; específicamente en la Figura 2b) y el bazo en comparación con los ratones administrados con OVA no modificado antes de la estimulación con el antígeno con LPS (Figura 2c), lo que demuestra tolerancia a la eliminación. Esta eficaz eliminación clonal exhibida en los ratones administrados con ERY1-OVA apoyó las observaciones anteriores del cebado cruzado mejorado de las células T CD8<sup>+</sup> OT-I y además mostró que el cebado cruzado se produjo en ausencia de la presentación de APC de las moléculas coestimuladoras para conducir a la tolerancia a la eliminación. Las administraciones intravenosas de ERY1-OVA causaron niveles de IgG sérica específica a OVA 39,8 veces más bajos a los 19 días después de la primera administración del antígeno (Figura 3) en comparación con los ratones tratados con OVA. Para validar aún más la inducción de la tolerancia inmunitaria específica al antígeno, el modelo de tolerancia a la estimulación de OT-I se combinó con un modelo de injerto tumoral que expresa OVA (Figura 2), con resultados favorables. Los resultados detallados en este ejemplo demuestran que la unión a los eritrocitos por ERY1-OVA induce tolerancia inmunitaria específica al antígeno. Esto se mostró en respuesta a una fuerte estimulación con el adyuvante, así como también a injertos celulares implantados que expresan un xenoantígeno. Además, la tolerancia se logró mediante la inactivación funcional y la eliminación de las células T CD8<sup>+</sup> reactivas a través de la interacción con el antígeno presente en los eritrocitos circulantes, independiente de la regulación de las células T CD4<sup>+</sup> directas. Estos experimentos detallados con ERY1, un péptido de unión a los eritrocitos de ratón, predicen resultados similares en humanos que usan péptidos de unión a los eritrocitos humanos, varios de los cuales se enseñan en la presente descripción. Además, habiendo demostrado que los ligandos peptídicos son efectivos, pueden obtenerse resultados similares mediante el uso de conjugados con otros ligandos de unión a los eritrocitos, por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o aptámeros,

con estos grupos que se unen a una molécula de la superficie de un eritrocito, por ejemplo, una de las proteínas o antígenos de la superficie establecidos en la presente descripción.

El Ejemplo 10 demostró además la generación de tolerancia a un antígeno tolerogénico mediante la fusión del antígeno tolerogénico a un scFv que se une a un eritrocito y por la preparación de la molécula de fusión como un medicamento para la administración a un paciente. El Ejemplo 10 demuestra la inducción de tolerancia al dominio inmunodominante MHC-I de OVA, que es el péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 3). Este antígeno se fusionó con el scFv TER-119, que se sabe que se une a los eritrocitos de ratón. La proliferación de células T CD8<sup>+</sup> OT-I, determinada por dilución de CFSE fluorescente medido por citometría de flujo, aumentó notablemente en ratones a los que se administró TER119-SIINFEKL en comparación con ERY1-OVA u OVA (Figura 8), lo que demuestra que la unión a los eritrocitos aumentó el cebado cruzado de las células T CD8<sup>+</sup> específicas al antígeno en comparación con el antígeno soluble SIINFEKL. Además, estos datos demuestran que los fragmentos de anticuerpos diseñados para unirse a los eritrocitos y mostrar epítomos inmunitarios se procesan eficientemente por las células inmunitarias para el cebado cruzado a las células T específicas al antígeno. Estos resultados en la presentación cruzada y el cebado cruzado son consistentes con otros estudios relacionados con la presentación del antígeno tolerogénico en MHC I por APC que envuelven el antígeno a partir de las células apoptóticas (Albert 1998, Green 2009). TER119-SIINFEKL y ERY1-OVA indujeron números mucho más altos de células T CD8<sup>+</sup> OT-I proliferantes de PD-1<sup>+</sup> y anexina-V<sup>+</sup> que OVA (Figura 13), lo que indica un destino agotado y apoptótico que conduce a la eliminación clonal. Este fenotipo de células T CD8<sup>+</sup> proliferantes es consistente con otros modelos reportados de transferencia adoptiva de OT-I, en los cuales la interacción regulada del receptor de célula T específica al antígeno por APC no puede inducir respuestas inflamatorias (Bursch, Rich, y otros, 2009).

Con referencia al Ejemplo 10, se demostró la capacidad de TER119-SIINFEKL y ERY1-OVA para prevenir las respuestas inmunitarias posteriores a una estimulación con el antígeno mediado por vacuna, incluso cuando se estimula con un adyuvante derivado de bacterias muy fuerte. Las moléculas de fusión con un scFv o un ligando peptídico para unirse a un eritrocito fueron, por lo tanto, eficaces para producir tolerancia.

El Ejemplo 11 muestra que es posible inducir tolerancia inmunitaria específica al antígeno hacia proteínas terapéuticas y proteínas con potencial terapéutico. Muchas proteínas terapéuticas inducen reacciones inmunitarias, haciendo que su uso clínico sea peligroso o ineficaz. La asparaginasa es una enzima terapéutica derivada de microbios que se usa para tratar la leucemia linfoblástica aguda, pero también induce respuestas inmunitarias peligrosas que evitan su uso repetido. Se usó un modelo de ratón. Se administró a los ratones una molécula de fusión de asparaginasa y un grupo de unión a los eritrocitos (el péptido ERY1) y se comparó con los ratones tratados con el fármaco clínico de asparaginasa. El fármaco de asparaginasa produjo anticuerpos pero la molécula de fusión no; esta prueba estableció que los niveles de anticuerpos podrían usarse como una medida de tolerancia. Luego se comprobó la tolerancia mediante la administración de la molécula de fusión a los ratones, seguida de la administración repetida del fármaco clínico de asparaginasa, y se observó que no había una respuesta potente de anticuerpos, incluso después de una estimulación muy agresiva mediante la administración repetida del fármaco. En contraste, los ratones que recibieron el fármaco pero no la molécula de fusión se volvieron inmunorreactivos y peligrosamente hipersensibles.

El Ejemplo 12 muestra que es posible la reversión inmunitaria. Los ratones que eran inmunorreactivos a una proteína se trataron para volverse tolerantes de la proteína. Se usó el modelo de ratón de asparaginasa del Ejemplo 11. Los ratones que eran inmunorreactivos al fármaco de asparaginasa se trataron con la molécula de fusión (aglutinante de asparaginasa y eritrocitos) y se hicieron tolerantes al fármaco de asparaginasa.

En contraste, los informes anteriores enseñan que el inmunorechazo se genera al unir un antígeno a la superficie de un eritrocito para producir una vacuna, y otros informes han usado antígenos encapsulados dentro de los eritrocitos para generar vacunas. Por ejemplo, cuando el antígeno se encapsula dentro de un eritrocito, se hace una vacuna (Murray y otros, Vaccine 24: 6129-6139 (2006)). O los antígenos conjugados a la superficie del eritrocito fueron inmunogénicos y se propusieron como vacunas (Chiarantini y otros, Vaccine 15 (3): 276-280 (1997)). Estas referencias muestran que el suministro de eritrocitos se aproxima a una respuesta inmunitaria tan buena como las obtenidas con vacunas normales con adyuvantes. Otros han informado que la colocación dentro de un eritrocito es necesaria para inducir tolerancia, tal como en la solicitud de patente WO 2011/051346, que también enseña varios medios para alterar la superficie de los eritrocitos para mejorar la eliminación de las células de Kupffer en el hígado. Esta misma solicitud también enseña la unión de los anticuerpos a las proteínas de la superficie de los eritrocitos como la glicoforina A, pero con el propósito de hacer complejos inmunitarios en el eritrocito para mejorar su eliminación por las células de Kupffer.

Las modalidades expuestas en la presente descripción proporcionan una composición para producir inmunotolerancia, la composición comprende una fusión molecular que comprende un antígeno tolerogénico y un grupo de unión a los eritrocitos que se une específicamente a un eritrocito en el paciente y de ese modo une el antígeno al eritrocito, en donde la fusión molecular se administra en una cantidad efectiva para producir inmunotolerancia a una sustancia que comprende el antígeno tolerogénico. El eritrocito y el paciente pueden estar libres de tratamientos que causen otras alteraciones en los eritrocitos, y sin reticulación de los eritrocitos, conjugaciones químicas covalentes, recubrimientos y otras alteraciones que no sean la unión específica del péptido. La fusión molecular puede comprender, o consistir en, el grupo de unión a los eritrocitos covalentemente unido de manera directa al antígeno. La fusión molecular puede comprender el grupo de unión a los eritrocitos unido a una partícula que se une al antígeno. La partícula puede comprender una micropartícula, una nanopartícula, un liposoma, un polimerosoma o una micela. El antígeno tolerogénico puede comprender una parte

de una proteína terapéutica, por ejemplo, un factor sanguíneo administrado a un paciente que padece una falta de producción del factor. Las modalidades incluyen los casos en donde: el paciente es un ser humano y el antígeno tolerogénico es una proteína humana de la cual el paciente es genéticamente deficiente; en donde el paciente es un ser humano y el antígeno tolerogénico comprende una parte de una proteína no humana; en donde el paciente es un ser humano y el antígeno tolerogénico comprende una parte de una proteína terapéutica diseñada que no se encuentra de forma natural en un ser humano; en donde el paciente es un ser humano y el antígeno tolerogénico comprende una parte de una proteína que comprende glicosilación no humana; en donde el antígeno tolerogénico comprende una parte de una proteína humana de enfermedad autoinmunitaria; en donde el antígeno tolerogénico es un antígeno en el trasplante de aoinjerto; en donde el antígeno tolerogénico comprende una parte de una sustancia que se elige del grupo que consiste en alimento humano; y/o en donde el grupo de unión a los eritrocitos se elige del grupo que consiste en un péptido, un anticuerpo y un fragmento de anticuerpo. Las modalidades incluyen materiales y composiciones de inducción de la tolerancia en donde el grupo de unión a los eritrocitos comprende un péptido que comprende al menos 5 residuos de aminoácidos consecutivos de una secuencia que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, y las sustituciones conservadoras de estas, en donde dicha secuencia se une específicamente a un eritrocito.

La fusión molecular puede elegirse para colocar el antígeno en el interior o el exterior del eritrocito. Sin vincularse a un mecanismo de acción particular, se presenta la siguiente teoría. En el hombre, aproximadamente el 1 % de los eritrocitos se vuelven apoptóticos (eritóticos) y se eliminan cada día, una gran cantidad de células, y sus proteínas se procesan de manera que se mantenga la tolerancia a los autoantígenos de los eritrocitos. Un antígeno diseñado para unirse a los eritrocitos mediante el uso del péptido ERY1 o un péptido de unión a los eritrocitos humanos, un anticuerpo o anticuerpo de cadena sencilla de unión a los eritrocitos, un aptámero de unión a los eritrocitos u otro agente de unión a los eritrocitos también puede provocar la misma respuesta tolerogénica. Dado que el método de última generación desarrollado por Miller y sus colegas (ver arriba) es engorroso, ya que requiere la recolección y la reacción de los esplenocitos de los donantes para su nueva administración, nuestro método de unión no covalente a los eritrocitos proporciona una alternativa más simple. A medida que la interacción eritrocito-ERY1 o eritrocito-péptido de unión a los eritrocitos humanos u otra biomolécula de afinidad (por ejemplo, anticuerpo de cadena sencilla, anticuerpo o aptámero) se produce espontáneamente después de la introducción del antígeno conjugado o fusión in vivo, el antígeno diseñado simplemente se administra mediante inyección, y la unión se produce in situ.

En algunos casos, el antígeno tolerogénico se deriva de una proteína del agente terapéutico a la que se desea tolerancia. Los ejemplos son los fármacos proteicos en su tipo salvaje, por ejemplo, el factor VIII o el factor IX humanos, a los cuales los pacientes no establecieron tolerancia central porque eran deficientes en esas proteínas; o los fármacos proteicos no humanos, usados en seres humanos. Otros ejemplos son los fármacos proteicos que se glicosilan en formas no humanas debido a la producción, o los fármacos proteicos diseñados, por ejemplo, que tienen secuencias no nativas que pueden provocar una respuesta inmunitaria no deseada. Los ejemplos de los antígenos tolerogénicos que son proteínas terapéuticas diseñadas que no se encuentran de forma natural en humanos incluyen proteínas humanas con mutaciones diseñadas, por ejemplo, mutaciones para mejorar las características farmacológicas. Los ejemplos de los antígenos tolerogénicos que comprenden glicosilación no humana incluyen proteínas producidas en células de levadura o insecto.

Las modalidades incluyen la administración de una proteína en alguna frecuencia X o dosis Y y también la administración de un antígeno de esa proteína en una frecuencia y/o dosis menor, por ejemplo, una frecuencia que no sea mayor que 0,2X o una dosis que no sea mayor que 0,2Y; los expertos apreciarán de inmediato que se contemplan todos los intervalos y los valores dentro de los intervalos explícitamente establecidos, por ejemplo, 0,01 o 0,05 X o algún intervalo entre ellos.

Las modalidades incluyen la elección del antígeno tolerogénico a partir de las proteínas que se administran a humanos que son deficientes en la proteína. Deficiente significa que el paciente que recibe la proteína no produce de forma natural suficiente proteína. Además, las proteínas pueden ser proteínas para las cuales un paciente es genéticamente deficiente. Dichas proteínas incluyen, por ejemplo, antitrombina-III, proteína C, factor VIII, factor IX, hormona del crecimiento, somatotropina, insulina, acetato de pramlintida, mecasermina (IGF-1),  $\beta$ -glucocerebrosidasa, alglucosidasa- $\alpha$ , laronidasa (aL-iduronidasa), idursulfasa (iduronato-2-sulfatasa), galsulfasa, agalsidasa- $\beta$  ( $\alpha$ -galactosidasa), inhibidor de la proteinasa  $\alpha$ -1 y albúmina. Por consiguiente, las modalidades incluyen una molécula de fusión para la tolerogénesis que comprende un grupo de unión a los eritrocitos y al menos un antígeno, con el grupo de unión a los eritrocitos que se une específicamente a, por ejemplo, glicoforina A o a una diana que se elige del grupo que consiste en banda 3, glicoforina B, glicoforina C u otros miembros del grupo diana de los eritrocitos. El grupo de unión a los eritrocitos se elige del grupo que consiste en ligandos peptídicos que se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 17.

Las modalidades incluyen la elección del antígeno tolerogénico a partir de anticuerpos terapéuticos y moléculas similares a anticuerpos, incluidos fragmentos de anticuerpos y proteínas de fusión con anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Estos incluyen anticuerpos no humanos (como el ratón), anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Se han observado respuestas inmunitarias incluso a anticuerpos humanizados en humanos (Getts, 2010). Por consiguiente, las modalidades incluyen una molécula de fusión para la tolerogénesis que comprende un grupo de unión a los eritrocitos y un antígeno, con el grupo de unión a los eritrocitos que se une específicamente a, por ejemplo, glicoforina A o a una diana que se elige del grupo que consiste en banda 3, glicoforina B, glicoforina C u otros miembros del grupo diana de los eritrocitos. El grupo de unión a los eritrocitos se elige del grupo que consiste en ligandos peptídicos que se seleccionan

del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 17.

- 5 Las modalidades incluyen la elección del antígeno tolerogénico a partir de proteínas que no son humanas. Los ejemplos de tales proteínas incluyen adenosina desaminasa, lipasa pancreática, amilasa pancreática, lactasa, toxina botulínica tipo A, toxina botulínica tipo B, collagenasa, hialuronidasa, papaína, L-asparaginasa, rasburicasa, lepirudina, estreptoquinasa, anistreplasa (complejo activador plasminógeno estreptoquinasa acilado), globulina antitrombótica, Fab inmunitario polivalente de crotalidae, Fab de suero inmunitario de digoxina, L-arginasa y L-metionasa.
- 10 Las modalidades incluyen la elección del antígeno tolerogénico a partir de los antígenos de trasplante de aloinjerto humano. Los ejemplos de estos antígenos son las subunidades de las diversas proteínas de haplotipo MHC clase I y MHC clase II, y polimorfismos de aminoácidos únicos en antígenos menores de los grupos sanguíneos, incluidos RhCE, Kell, Kidd, Duffy y Ss.
- 15 En algunos casos, el antígeno tolerogénico es un antígeno propio contra el cual un paciente ha desarrollado una respuesta autoinmunitaria o puede desarrollar una respuesta autoinmunitaria. Los ejemplos son proinsulina (diabetes), colágenos (artritis reumatoide), proteína básica de mielina (esclerosis múltiple).
- 20 Por ejemplo, la diabetes mellitus tipo 1 (T1D) es una enfermedad autoinmunitaria en la cual las células T que reconocen las proteínas de los islotes se liberan de la regulación inmunitaria y le indican al sistema inmunitario que destruya el tejido pancreático. Se han descubierto numerosos antígenos proteicos que son dianas de tales células T diabetogénicas, incluidas insulina, GAD65, cromogranina A, entre otros. En el tratamiento o prevención de la T1D, sería útil inducir tolerancia inmunitaria específica al antígeno hacia los antígenos diabetogénicos definidos para inactivar funcionalmente o eliminar los clones de células T diabetogénicas. El Ejemplo 14 detalla cómo una molécula de fusión que presenta el mimotopo de cromogranina-A (ChrA) como un antígeno tolerogénico generó con éxito tolerancia a ChrA, basado en los datos de células T que se establecieron como predictivos en los otros Ejemplos. Por consiguiente, las modalidades incluyen una molécula de fusión para la tolerogénesis que comprende cromogranina-A, un antígeno o parte antigénica de esta, o un mimotopo de esta con un grupo de unión a los eritrocitos, con el grupo de unión a los eritrocitos que se une específicamente a, por ejemplo, glicoforina A o a una diana que se elige del grupo que consiste en banda 3, glicoforina B, glicoforina C u otros miembros del grupo diana de los eritrocitos. El grupo de unión a los eritrocitos puede elegirse, por ejemplo, del grupo que consiste en ERY19', ERY59', ERY64', ERY123', ERY141', ERY162' y las sustituciones conservadoras de estos.
- 30
- 35 En consecuencia, puede lograrse tolerancia y/o retraso del inicio o la progresión de las enfermedades autoinmunitarias para varias de las muchas proteínas que son proteínas autoinmunitarias humanas, un término que se refiere a varias enfermedades autoinmunitarias en donde la proteína o proteínas que causan la enfermedad se conocen o pueden establecerse por pruebas de rutina.
- 40 Las modalidades incluyen probar a un paciente para identificar una proteína autoinmunitaria y generar un antígeno para usar en una fusión molecular y generar inmunotolerancia a la proteína. Las modalidades incluyen un antígeno, o la elección de un antígeno de una o más de las siguientes proteínas. En la diabetes mellitus tipo 1, se han identificado varios antígenos principales: insulina, proinsulina, preproinsulina, ácido glutámico descarboxilasa-65 (GAD-65), GAD-67, proteína 2 asociada a insulino (IA-2) y proteína 2β asociada a insulino (IA-2β); otros antígenos incluyen ICA69, ICA12 (SOX-13), carboxipeptidasa H, Imogen 38, GLIMA 38, cromogranina-A, HSP-60, carboxipeptidasa E, periferina, transportador de glucosa 2, proteína asociada a pancreatitis/hepatocarcinoma-intestino-páncreas, S100β, proteína ácida fibrilar glial, gen regenerador II, homeobox duodenal pancreático 1, quinasa de la distrofia miotónica, proteína relacionada con la subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa específica de los islotes y receptores 1-5 acoplados a la proteína G SST. En las enfermedades autoinmunitarias de la tiroides, incluidas la tiroiditis de Hashimoto y la enfermedad de Graves, los antígenos principales incluyen tiroglobulina (TG), peroxidasa tiroidea (TPO) y receptor de tirotrópina (TSHR); otros antígenos incluyen importador yodo-sodio (NIS) y megalina. En la dermatopatía y la oftalmopatía asociadas a la tiroides, además de los autoantígenos tiroideos, incluido TSHR, un antígeno es el receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1. En el hipoparatiroidismo, un antígeno principal es el receptor sensible al calcio. En la enfermedad de Addison, los antígenos principales incluyen 21-hidroxilasa, 17α-hidroxilasa y la enzima de escisión de la cadena lateral P450 (P450<sub>scc</sub>); otros antígenos incluyen el receptor de ACTH, P450<sub>c21</sub> y P450<sub>c17</sub>. En la insuficiencia ovárica prematura, los antígenos principales incluyen el receptor de FSH y la α-enolasa. En la hipofisitis autoinmunitaria, o enfermedad autoinmunitaria hipofisaria, los antígenos principales incluyen el factor de proteína específica de la glándula pituitaria (PGSF) 1a y 2; otro antígeno es la yodotironina deiodinasa tipo 2. En la esclerosis múltiple, los antígenos principales incluyen la proteína básica de la mielina, la glucoproteína oligodendroglítica de la mielina y la proteína proteolípida. En la artritis reumatoide, un antígeno principal es el colágeno II. En la inmunogastroitis, un antígeno principal es H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa. En la anemia perniciosa, un antígeno principal es el factor intrínseco. En la enfermedad celíaca, los antígenos principales son la gliadina y la transglutaminasa tisular. En el vitiligo, un antígeno principal es la tirosinasa y las proteínas 1 y 2 relacionadas con la tirosinasa. En la miastenia gravis, un antígeno principal es el receptor de acetilcolina. En el pénfigo vulgar y sus variantes, los antígenos principales son la desmogleína 3, 1 y 4; otros antígenos incluyen penfaxina, desmocolinas, placoglobina, perlaquina, desmoplaquinas y receptor de acetilcolina. En el pénfigoide ampolloso, los antígenos principales incluyen BP180 y BP230; otros antígenos incluyen plectina y laminina 5. En la dermatitis herpetiforme de Duhring, los antígenos principales incluyen endomisio y transglutaminasa tisular. En la epidermolisis ampollosa adquirida, un antígeno principal
- 60
- 65

es el colágeno VII. En la esclerosis sistémica, los antígenos principales incluyen la metaloproteínasa de la matriz 1 y 3, la chaperona molecular específica de colágeno proteína de choque térmico 47, fibrilina-1 y receptor de PDGF; otros antígenos incluyen Scl-70, U1 RNP, Th/To, Ku, Jol, NAG-2, proteínas centrómeras, topoisomerasa I, proteínas nucleolares, ARN polimerasa I, II y III, PM-Slc, fibrilarina y B23. En la enfermedad mixta del tejido conectivo, un antígeno principal es U1snRNP. En el síndrome de Sjogren, los antígenos principales son los antígenos nucleares SS-A y SS-B; otros antígenos incluyen fodrina, poli(ADP-ribosa) polimerasa y topoisomerasa. En el lupus eritematoso sistémico, los antígenos principales incluyen proteínas nucleares que incluyen SS-A, grupo 1 de alta movilidad (HMGB1), nucleosomas, proteínas histonas y ADN bicatenario. En el síndrome de Goodpasture, los antígenos principales incluyen proteínas de la membrana basal glomerular, incluido el colágeno IV. En la cardiopatía reumática, un antígeno principal es la miosina cardíaca. Otros autoantígenos revelados en el síndrome poliglandular autoinmunitario tipo 1 incluyen L-aminoácidos aromáticos descarboxilasa, histidina descarboxilasa, ácido cisteín sulfínico descarboxilasa, triptófano hidroxilasa, tirosina hidroxilasa, fenilalanina hidroxilasa, citocromos P450 hepáticos P4501A2 y 2A6, SOX-9, SOX-10, receptor sensible al calcio, y los interferones tipo 1 interferón alfa, beta y omega. El Ejemplo 15 proporciona una guía detallada para la tolerogénesis a dichas proteínas, y describe específicamente un proceso con la insulina como ejemplo.

En algunos casos, el antígeno tolerogénico es un antígeno extraño contra el cual un paciente ha desarrollado una respuesta inmunitaria no deseada. Los ejemplos son los antígenos alimentarios. Las modalidades incluyen probar a un paciente para identificar el antígeno extraño y generar una fusión molecular que comprenda el antígeno y tratar al paciente para que desarrolle la inmunotolerancia al antígeno o al alimento. Se proporcionan ejemplos de tales alimentos y/o antígenos. Los ejemplos son del maní: conarachina (Ara h 1), alérgeno II (Ara h 2), aglutinina de arachis, congutina (Ara h 6); de la manzana: proteína homóloga de resistencia a enfermedades/alérgeno principal 31 kda (Mal d 2), proteína de transferencia de lípidos (Mal d 3), alérgeno principal Mal d 1,03D (Mal d 1); de la leche:  $\alpha$ -lactalbúmina (ALA), lactotransferrina; del kiwi: actinidina (Act c 1, Act d 1), fitocistatina, proteína similar a la taumatina (Act d 2), kiwelina (Act d 5); de la mostaza: albúmina 2S (Sin a 1), globulina 11 S (Sin a 2), proteína de transferencia de lípidos (Sin a 3), profilina (Sin a 4); del apio: profilina (Api g 4), glucoproteína de alto peso molecular (Api g 5); del camarón: alérgeno Pen a 1 (Pen a 1), alérgeno Pen m 2 (Pen m 2), isoforma rápida de tropomiosina; del trigo y/u otros cereales: glutenina de alto peso molecular, glutenina de bajo peso molecular, alfa- y gamma-gliadina, hordeína, secalina, avenina; de la fresa: alérgeno principal de la fresa Fra a 1-E (Fra a 1), del plátano: profilina (Mus xp 1).

Muchos fármacos proteicos que se usan en medicina humana y veterinaria inducen respuestas inmunitarias, lo que genera riesgos para el paciente y limita la eficacia del fármaco. Esto puede ocurrir con proteínas humanas que se han diseñado, con proteínas humanas usadas en pacientes con deficiencias congénitas en la producción de esa proteína, y con proteínas no humanas. Sería ventajoso inducir tolerancia en un receptor a estos fármacos proteicos antes de la administración inicial, y sería ventajoso inducir tolerancia en un receptor a estos fármacos proteicos después de la administración inicial y el desarrollo de la respuesta inmunitaria. En pacientes con autoinmunidad, se conocen los autoantígenos a los que se desarrolla la autoinmunidad. En estos casos, sería ventajoso inducir tolerancia en los sujetos en riesgo antes del desarrollo de la autoinmunidad, y sería ventajoso inducir tolerancia en los sujetos en el momento o después del desarrollo de indicadores biomoleculares de autoinmunidad incipiente. Por ejemplo, en la diabetes mellitus tipo 1, los indicadores inmunológicos de autoinmunidad están presentes antes de la destrucción generalizada de las células beta en el páncreas y el inicio de la enfermedad clínica implicada en la homeostasis de la glucosa. Sería ventajoso inducir tolerancia en un sujeto después de la detección de estos indicadores inmunológicos antes del inicio de la enfermedad clínica.

Un trabajo reciente dirigido por Miller y sus colegas ha demostrado que la conjugación covalente de un antígeno con esplenocitos alogénicos ex vivo genera tolerancia inmunitaria específica al antígeno cuando se administra por vía intravenosa en ratones (Godsel, Wang, y otros, 2001; Luo, Pothoven, y otros, 2008). El proceso involucra la recolección de células esplénicas presentadoras de antígeno del donante y hacerlas reaccionar químicamente en un esquema de reacción de reticulación de ácido amina-carboxílico. La técnica ha demostrado ser efectiva para inducir tolerancia específica al antígeno para modelos de esclerosis múltiple en ratones (Godsel, Wang, y otros, 2001), diabetes tipo 1 de nueva aparición (Fife, Guleria, y otros, 2006) y trasplantes de islotes alogénicos (Luo, Pothoven, y otros, 2008). Aunque se desconoce el mecanismo exacto responsable de la respuesta tolerogénica, se propone que un requisito importante implica la presentación del antígeno sin la expresión de las moléculas coestimuladoras en las células acopladas al antígeno apoptótico (Miller, Turley, y otros, 2007). También se ha contemplado encapsular antígenos dentro de los eritrocitos fantasmas, procesar los eritrocitos ex vivo y reinyectarlos, como en el documento WO2011/051346.

## 55 Administración

Muchas modalidades de la invención expuestas en la presente descripción describen las composiciones que pueden administrarse a un paciente humano u otro animal. Las modalidades de la invención incluyen, por ejemplo, fusiones moleculares, proteínas de fusión, ligandos peptídicos, anticuerpos, scFv, que reconocen los antígenos en los eritrocitos o los tumores o la vasculatura tumoral, así como también las combinaciones de estos. Estas composiciones pueden prepararse como composiciones farmacéuticamente aceptables y con portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados.

Las composiciones que se unen a los eritrocitos pueden hacerlo con especificidad. Esta especificidad proporciona la unión in vivo de las composiciones con los eritrocitos, así como también los procesos ex vivo alternativos. Por consiguiente, las composiciones pueden inyectarse directamente en una vasculatura del paciente. Una alternativa es la inyección en un

tejido, por ejemplo, muscular, dérmico o subcutáneo, para el contacto y la absorción posterior de los eritrocitos. Una modalidad de la invención es una composición para inducir la tolerogénesis en un paciente que comprende la administración de un antígeno tolerizante al paciente en asociación con un grupo de unión a los eritrocitos para unir de ese modo el antígeno a un eritrocito in vivo; la unión in vivo puede realizarse sin el procesamiento ex vivo de los eritrocitos. Este proceso puede realizarse en donde el eritrocito no está hecho para ser apoptótico como resultado del proceso. Este proceso puede realizarse de modo que esté libre (no implique) de exponer los eritrocitos a uno o más de: un agente de reticulación; un agente de reticulación que reticula moléculas de la superficie de un eritrocito; un agente de reticulación que comprende al menos dos grupos funcionales; un agente de reticulación que forma una unión covalente con un eritrocito; grupos funcionales que forman un enlace covalente con un eritrocito; y un antígeno y/o sustancia antigénica que se une covalentemente al eritrocito. El proceso puede realizarse de manera que los eritrocitos y/o los antígenos estén libres de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC; también EDAC o EDCI) y también pueden estar libres de cualquier reacción con una carbodiimida. Este proceso puede realizarse con eritrocitos autólogos y puede estar libre de eritrocitos alogénicos.

Pueden usarse portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables para administrar las modalidades como se describe en la presente descripción. El excipiente se refiere a una sustancia inerte usada como diluyente o vehículo para un agente terapéutico. Los portadores farmacéuticamente aceptables se usan, en general, con un compuesto para hacer que el compuesto sea útil para una terapia o como un producto. En general, para cualquier sustancia, un portador farmacéuticamente aceptable es un material que se combina con la sustancia para la administración a un animal. Los portadores farmacéuticos convencionales, acuosos, polvos o bases aceitosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o convenientes. En algunos casos, el portador es esencial para la administración, por ejemplo, para solubilizar un compuesto insoluble para la administración líquida; un amortiguador para el control del pH de la sustancia para preservar su actividad; o un diluyente para evitar la pérdida de la sustancia en el recipiente de almacenamiento. Sin embargo, en otros casos, el portador es por conveniencia, por ejemplo, un líquido para una administración más conveniente. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la presente descripción pueden sintetizarse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticamente aceptables se purifican altamente para estar libres de contaminantes, son biocompatibles y no tóxicas, son adecuadas para la administración a un paciente. En el caso del agua como portador, el agua se purifica altamente y se procesa para estar libre de contaminantes, por ejemplo, endotoxinas.

Los compuestos descritos en la presente descripción deben administrarse típicamente mezclados con diluyentes, excipientes, extendedores o portadores farmacéuticos adecuados (denominados en la presente descripción como portador farmacéuticamente aceptable, o un portador) que se seleccionan adecuadamente con respecto a la forma de administración prevista y como consistentes con las prácticas farmacéuticas convencionales. Por lo tanto, el compuesto suministrable puede prepararse en una forma adecuada para la inyección oral, rectal, tópica, intravenosa, la inyección intraarticular o la administración parenteral. Los portadores incluyen sólidos o líquidos, y el tipo de portador se elige en función del tipo de administración que se usa. Los aglutinantes, lubricantes, agentes desintegrantes, agentes colorantes, agentes saborizantes, agentes inductores de flujo y agentes fundentes adecuados pueden incluirse como portadores, por ejemplo, para píldoras. Por ejemplo, un componente activo puede combinarse con un portador inerte oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable, tal como lactosa, gelatina, agar, almidón, sacarosa, glucosa, metil celulosa, estearato de magnesio, fosfato dicálcico, sulfato cálcico, manitol, sorbitol y similares. Los compuestos pueden administrarse de modo oral en formas de dosificación sólida, tales como cápsulas, comprimidos y polvos, o en formas de dosificación líquidas, como elixires, jarabes y suspensiones. Los compuestos activos también pueden administrarse por vía parental, en formas de dosificación líquidas estériles. También pueden usarse amortiguadores para lograr un pH fisiológico u osmolaridad.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Caracterización de la diana molecular de unión a los eritrocitos de ratón

Resultado: Para buscar una diana molecular para el péptido ERY1, se emplearon técnicas de reducción de afinidad mediante el uso de un péptido soluble biotilado; este método reveló la glicoforina-A (GYPA) como el ligando de ERY1 en la membrana de los eritrocitos. Cuando se incubaron los eritrocitos completos con el péptido ERY1 funcionalizado con biotina y un reticulante fotoactivable, se conjugó una única proteína de 28 kDa con el complejo péptido-biotina, según lo detectado por una electrotransferencia con estreptavidina. El lisado de reacción se lavó exhaustivamente y se purificó mediante el uso de perlas magnéticas con estreptavidina para asegurar que no quedaran proteínas sin marcar del lisado de eritrocitos. Como se esperaba, el péptido no compatible no pudo conjugarse con ninguna proteína eritrocitaria. El péptido no compatible, PLLTVGMDLWPW (SEQ ID NO: 2), se diseñó para contener los mismos residuos de aminoácidos que ERY1, y para que coincidiera con su topografía de hidrofobicidad. La evidencia del tamaño aparente de la proteína que interactúa sugirió varias proteínas de membrana de un solo paso, más pequeñas como ligandos probables, concretamente, las glicoforinas. La electrotransferencia anti-GYPA de las mismas muestras purificadas de la reacción de reticulación confirmó que la proteína biotilada candidata fue GYPA.

La colocalización del fago ERY1 con GYPA se analizó mediante microscopía confocal de alta resolución. GYPA se expresa y presenta de forma natural como parte de un complejo que se compone por varias proteínas de membrana y citoesqueléticas (Mohandas y Gallagher, 2008). Esto es visualmente evidente en la tinción de GYPA, por lo que se observó un marcaje no uniforme en la periferia ecuatorial de la célula. El marcaje con el fago ERY1 produjo topografías de tinción

extremadamente similares. Un alto coeficiente de solapamiento de 0,97 en el análisis de colocalización corroboró la conclusión de que el fago ERY1 y el anti-GYPA se unen a la misma proteína. La agrupación de GYPA también se observó en eritrocitos marcados con fago de biblioteca, sin embargo, no hubo unión de fagos, por lo que no fue evidente la colocalización.

Método: El péptido ERY1 (H<sub>2</sub>N-WMVLPWLPGLDGGSGCRG-CONH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 19) y el péptido no compatible (H<sub>2</sub>N-PLLTVGMDLWPWGSGCRG-CONH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 20) se sintetizaron mediante el uso de la química estándar f-moc en fase sólida sobre resina TGR. El péptido se escindió de la resina en un 95 % de ácido trifluoroacético, un 2,5 % de etanodiol, un 2,5 % de agua, y se precipitó en éter dietílico helado. La purificación se realizó en una HPLC preparativa Waters-MS mediante el uso de una columna de fase inversa C18.

El ERY1 y el péptido no compatible se conjugaron con Mts-Atf-biotina (Thermo Scientific) según lo sugerido por el fabricante. En resumen, los péptidos se solubilizaron en PBS/DMF y reaccionaron con 1,05 equivalentes de Mts-atf-biotina durante la noche a 4 °C. Después de la clarificación de la reacción por centrifugación, el péptido biotinilado se incubó con eritrocitos en PBSA-50 durante 1 hora a 37 °C, las células se lavaron dos veces en PBS nuevo y se irradiaron con UV a 365 nm durante 8 minutos a temperatura ambiente. Las células se lisaron por sonicación y el lisado se purificó mediante el uso de perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (Invitrogen). El eluato se ejecutó en una SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de PVDF, y se realizó una electrotransferencia con estreptavidina-HRP (R&D Systems) o anti-GYPA de ratón.

#### Ejemplo 2: Caracterización de la unión a los eritrocitos humanos

Resultado: Para caracterizar los péptidos seleccionados que se unen a los eritrocitos humanos, las bacterias que muestran cada péptido individual se sometieron a ensayos de unión con múltiples tipos de células. Seis (ERY19, ERY59, ERY64, ERY123, ERY141 y ERY162) de siete péptidos se unen específicamente a los eritrocitos humanos en comparación con la unión a células 293T epiteliales humanas y HUVEC endoteliales humanas. Además, los péptidos se unen a los tipos de sangre humana A y B, pero no a la sangre de ratón, lo que indica que estos péptidos eran específicos de la sangre humana, pero no dependientes de los antígenos comunes del grupo sanguíneo. Los péptidos se sintetizan mediante el uso de la química estándar f-moc en fase sólida, se conjugan con nanopartículas y se analizan para determinar la unión a tipos de células individuales como se indicó anteriormente. La unión a las superficies de los eritrocitos se estudió mediante el uso de la microscopía y la citometría de flujo.

Ejemplo 3: Inducción de tolerancia inmunológica específica al antígeno a través de la unión no covalente a los eritrocitos con el antígeno conjugado con el péptido ERY1 o el antígeno conjugado con el péptido de unión a los eritrocitos humanos

Para obtener una unión biofísica fuerte y específica de un antígeno a los eritrocitos, usamos un péptido sintético de 12 aminoácidos (ERY1) que descubrimos mediante la presentación en fagos para unirse específicamente a la glicoforina-A de ratón (Kontos y Hubbell, 2010). En esta investigación, el antígeno modelo OVA se usó con una cepa de ratón transgénico (OT-I) cuya población de células T CD8<sup>+</sup> expresa el receptor de células T específico para el péptido SIINFEKL inmunodominante MHC I de OVA (SEQ ID NO: 3). El péptido ERY1 se conjugó químicamente con OVA para generar una variante de OVA (ERY1-OVA) que se une a los eritrocitos de ratón con alta afinidad y especificidad (Figura 1a). La microscopía confocal de alta resolución confirmó las observaciones anteriores sobre la unión de ERY1 (Kontos y Hubbell, 2010), es decir, la localización en la periferia ecuatorial de la membrana celular, sin translocación intracelular de la proteína conjugada con ERY1. La unión mediada por ERY1 a la glicoforina-A fue específica de la secuencia, ya que una variante de OVA conjugada con un péptido no compatible (MIS-OVA), que contiene aminoácidos idénticos a ERY1 pero codificados en la secuencia primaria, mostró una unión insignificante (Figura 1b). El OVA conjugado solo con la molécula de reticulación usada para conjugar el péptido no mostró ninguna afinidad medible hacia los eritrocitos, lo que confirma que la unión de ERY1-OVA resultó de la interacción no covalente entre el péptido ERY1 y la glicoforina-A en la superficie del eritrocito. Además, ERY1-OVA se une a los eritrocitos con alta afinidad con una constante de disociación similar a un anticuerpo (K<sub>d</sub>) de 6,2 ± 1,3 nM, según se determinó por las medidas de equilibrio de unión (Figura 1c).

La unión de ERY1-OVA a los eritrocitos circulantes se validó *in vivo* después de la administración intravenosa en los ratones. Las muestras de sangre completa tomadas 30 minutos después de la inyección de 150 µg de OVA o ERY1-OVA confirmaron la capacidad específica de unión a los eritrocitos de ERY1-OVA, incluso en medio del entorno complejo heterogéneo de la sangre y la vasculatura. De acuerdo con la asociación a la glicoforina-A, ERY1-OVA se une a los eritrocitos (CD45<sup>-</sup>) pero no a los leucocitos (CD45<sup>+</sup>). La unión de ERY1-OVA fue imparcial en cuanto al estado apoptótico de los eritrocitos, uniéndose fuertemente a ambas poblaciones CD45<sup>-</sup> anexina-V<sup>-</sup> y anexina-V<sup>+</sup>. Los estudios farmacocinéticos del conjugado de OVA demostraron que la unión de los eritrocitos ERY1-OVA fue de larga duración *in vivo*, exhibiendo una vida media en la superficie celular de 17,2 h. ERY1-OVA permaneció unido a los eritrocitos hasta 72 h después de la administración; durante este período de tiempo, aproximadamente el 13 % de los eritrocitos se eliminan en el ratón (Khandelwal y Saxena, 2006). La cuantificación de ERY1-OVA unido a los eritrocitos *in vivo* mostró una carga relativamente alta de 0,174 ± 0,005 ng de OVA por 10<sup>6</sup> eritrocitos.

Para excluir cualquier efecto fisiológico potencial de la carga de OVA sobre la función de los eritrocitos, los parámetros hematológicos se caracterizaron en momentos variables después de la administración intravenosa de ERY1-OVA u OVA. La unión a los eritrocitos por ERY1-OVA no produjo diferencias detectables en el hematocrito, el volumen corpuscular o

el contenido de hemoglobina eritrocitaria, en comparación con la administración de OVA. Estos resultados demuestran que la unión a los eritrocitos mediada por la glicoforina-A con el antígeno no alteró sus parámetros hematológicos.

Para revelar las dianas celulares del antígeno unido a los eritrocitos tras la administración, se inyectó a los ratones por vía intravenosa la proteína de alofococianina altamente fluorescente, conjugada con ERY1 (ERY1-alofococianina) o el péptido MIS (MIS-alofococianina). El análisis por citometría de flujo de las poblaciones de DC esplénicas 12 y 36 h después de la administración mostró una captación mejorada en 9,4 veces de ERY1-alofococianina por las DCs MHCII<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> en comparación con MIS-alofococianina, pero una absorción similar de ERY1-alofococianina y MIS-alofococianina por las DCs MHCII<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>. Además, se descubrió que las DCs esplénicas MHCII<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD205<sup>+</sup> captan ERY1-alofococianina hasta 3,0 veces más que MIS-alofococianina, aunque la magnitud absoluta fue notablemente menor que para otras poblaciones DC en el bazo. Tal orientación del antígeno hacia las DCs esplénicas CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> CD205<sup>+</sup> y no activadas podrían fortalecer el potencial tolerogénico de la unión a los eritrocitos, ya que estas poblaciones se implican ampliamente en la tolerogénesis dirigida por células apoptóticas (Ferguson, Choi, y otros, 2011; Yamazaki, Dudziak, y otros, 2008). En el hígado, la ERY1-alofococianina también mejoró enormemente la absorción por los hepatocitos (CD45<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> CD1d<sup>+</sup>; por 78,4 veces) y las células estrelladas hepáticas (CD45<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> CD1d<sup>+</sup>; en 60,6 veces) en comparación con MIS-alofococianina; ambas poblaciones se han reportado como células presentadoras de antígeno que desencadenan tolerancia a la eliminación de células T CD8<sup>+</sup> (Holz, Warren, y otros, 2010; Ichikawa, Mucida, y otros, 2011; Thomson y Knolle, 2010). Curiosamente, dicha absorción no se observó en las DC del hígado (CD45<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>) o células de Kupffer (CD45<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>), que sirven como miembros del sistema reticuloendotelial que ayudan a eliminar los eritrocitos y las partículas recubiertas del complemento. El aumento de la absorción del antígeno unido a los eritrocitos por las poblaciones de células hepáticas y esplénicas tolerogénicas sugiere el potencial de un mecanismo interconectado complejo de eliminación de las células T específicas al antígeno dirigidas por la interacción de células hepáticas no linfoides y células esplénicas canónicas.

Se observó que la unión a los eritrocitos de ERY1-OVA conduce a una presentación cruzada eficaz del epítipo inmunodominante MHC I de OVA (SIINFEKL) (SEQ ID NO: 3) por las APCs y el cebado cruzado correspondiente de células T reactivas. Las células T CD8<sup>+</sup> OT-I marcadas con CFSE (CD45.2<sup>+</sup>) se transfirieron adoptivamente a ratones CD45.1<sup>+</sup>. Se realizaron mediciones de la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> OT-I durante 5 días después de la administración intravenosa de 10  $\mu$ g de OVA, 10  $\mu$ g de ERY1-OVA, o 10  $\mu$ g de un antígeno de unión a los eritrocitos irrelevante, ERY1-glutatión-S-transferasa (ERY1-GST). La proliferación de las células T CD8<sup>+</sup> OT-I, determinada por dilución de CFSE fluorescente medido por citometría de flujo, aumentó notablemente en los ratones a los que se administró ERY1-OVA en comparación con OVA, lo que demuestra que la unión a los eritrocitos aumentó el cebado cruzado de las células T CD8<sup>+</sup> específicas al antígeno en comparación con el antígeno soluble. También se obtuvieron resultados similares mediante la administración de una dosis de antígeno 10 veces menor de 1  $\mu$ g, lo que demuestra el amplio intervalo dinámico de eficacia de la proliferación de las células T CD8<sup>+</sup> OT-I inducida por el antígeno unido a los eritrocitos. Los resultados sobre la presentación cruzada y el cebado cruzado son consistentes con otros estudios sobre la presentación del antígeno tolerogénico en MHC I por APC que envuelven el antígeno a partir de las células apoptóticas (Albert, Pearce, y otros, 1998; Green, Ferguson, y otros, 2009).

Para distinguir las células T que se expanden en un fenotipo efector funcional de las que se expanden y eliminan, la proliferación de las células T CD8<sup>+</sup> OT-I para anexina-V se analizaron como un sello distintivo de apoptosis y, por lo tanto, de eliminación. ERY1-OVA indujo números mucho más altos de células T CD8<sup>+</sup> OT-I proliferantes de anexina-V<sup>+</sup> que OVA (Figura 12d), lo que sugiere un destino apoptótico que eventualmente conduciría a la eliminación clonal. Las mismas células T CD8<sup>+</sup> OT-I proliferantes inducidas por la administración de ERY1-OVA exhibieron un fenotipo experimentado al antígeno en dosis de 1 y 10  $\mu$ g, lo que muestra CD44 regulado positivamente y CD62L regulado negativamente. Este fenotipo de células T CD8<sup>+</sup> proliferantes es consistente con otros modelos reportados de transferencia adoptiva de OT-I, en los cuales la interacción regulada del receptor de célula T específica al antígeno por APC no puede inducir respuestas inflamatorias (Bursch, Rich, y otros, 2009).

Mediante el uso de un modelo de tolerancia a la estimulación de OT-I establecido (Liu, Iyoda, y otros, 2002) (Figura 2a), se demostró que ERY1-OVA previene las respuestas inmunitarias posteriores a la estimulación con el antígeno mediado por la vacuna, incluso con un adyuvante derivado de bacterias muy fuerte. Para inducir tolerancia, administramos por vía intravenosa 10  $\mu$ g de OVA o ERY1-OVA 1 y 6 días después de la transferencia adoptiva de células T CD8<sup>+</sup> OT-I (CD45.2<sup>+</sup>) a los ratones CD45.1<sup>+</sup>. Después de 9 días adicionales para permitir la eliminación potencial de las células T transferidas, estimulamos a los ratones receptores con OVA con adyuvante con lipopolisacárido (LPS) mediante inyección intradérmica. La caracterización de las células de los ganglios linfáticos de drenaje y el bazo, así como sus respuestas inflamatorias 4 días después de la estimulación, nos permitió determinar si la eliminación realmente tuvo lugar.

La administración intravenosa de ERY1-OVA resultó en reducciones profundas en las poblaciones de células T CD8<sup>+</sup> OT-I en los ganglios linfáticos de drenaje (Figura 2; específicamente en la Figura 2b) y bazo en comparación con los ratones administrados con OVA no modificado antes de la estimulación con el antígeno con LPS (Figura 2c), lo que demuestra la tolerancia a la eliminación. Los ganglios linfáticos de drenaje de los ratones tratados con ERY1-OVA contenían 11 veces menos células T CD8<sup>+</sup> OT-I en comparación con los ratones tratados con OVA, y 39 veces menos que los ratones de control de la estimulación que no recibieron las inyecciones intravenosas del antígeno; las respuestas en las células del bazo fueron similares. Esta eficaz eliminación clonal exhibida en los ratones administrados con ERY1-OVA apoyó las observaciones anteriores del aumento del cebado cruzado de células T CD8<sup>+</sup> OT-I y además mostró que el cebado

cruzado se produjo en ausencia de la presentación de APC de las moléculas coestimuladoras para conducir a la tolerancia a la eliminación.

Para evaluar aún más la respuesta inmunitaria después de la estimulación con el antígeno, la naturaleza inflamatoria de las células residentes de los ganglios linfáticos y el bazo se caracterizó por la expresión de interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) por las células T CD8<sup>+</sup> OT-I (Figura 2d). Después de la estimulación con OVA y LPS, los ganglios linfáticos de los ratones tratados previamente con ERY1-OVA albergaban 53 veces menos células que expresan IFN $\gamma$  en comparación con los ratones de control de la estimulación (que previamente no recibían antígeno), y más de 19 veces menos células que expresan IFN $\gamma$  en comparación con los ratones previamente tratados con una dosis equivalente de OVA (Figura 2e), lo que demuestra la importancia de la unión a los eritrocitos en la protección tolerogénica a la estimulación; las respuestas en las células del bazo fueron similares. Además, de la pequeña población de células T CD8<sup>+</sup> OT-I presente en los ganglios linfáticos y bazo de los ratones previamente tratados con ERY1-OVA, un porcentaje menor expresó IFN $\gamma$ , lo que sugiere la inactivación clonal. Además, la magnitud de los niveles totales de IFN $\gamma$  producidos por las células aisladas de los ganglios linfáticos de drenaje con la reestimulación con SIINFEKL se redujo sustancialmente en los ratones previamente tratados con ERY1-OVA (Figura 2f), la unión a los eritrocitos redujo los niveles de IFN $\gamma$  16 veces en comparación con la administración de OVA y más de 115 veces en comparación con los controles de la estimulación. Es de destacar que el fenómeno supresor también se correlacionó con la expresión de interleucina-10 (IL-10) regulada negativamente, ya que las células de los ganglios linfáticos de los ratones previamente tratados con ERY1-OVA expresaron 38 % y 50 % menos de IL-10 en comparación con los tratados previamente con OVA y los ratones de control de la estimulación, respectivamente (Figura 2g). Típicamente considerada la citocina expresada en células T CD4<sup>+</sup> reguladora en el contexto de la comunicación de las células T APC-T para amortiguar las respuestas Th1 (Darrah, Hegde, y otros, 2010; Lee y Kim, 2007), la expresión de IL-10 era dispensable para la desensibilización a la estimulación. La regulación negativa similar de IL-10 se ha implicado en la tolerogénesis mediada por células T CD8<sup>+</sup> (Fife, Guleria, y otros, 2006; Amaboldi, Roth-Walter, y otros, 2009; Saint-Lu, Tourdot, y otros, 2009). La unión a los eritrocitos también atenuó sustancialmente las respuestas inmunitarias humorales contra el antígeno, ya que los ratones tratados con ERY1-OVA exhibieron títulos de IgG en suero específica al antígeno 100 veces más bajos en comparación con los ratones tratados con OVA soluble (Figura 2h). Se observó una reducción similar en la reducción del título de IgG específica a OVA como resultado de la unión a los eritrocitos en ratones (CD45.2<sup>+</sup>) C57BL/6 transferido no adoptivamente. Después de dos administraciones intravenosas de 1  $\mu$ g de OVA o ERY1-OVA con 7 días de diferencia, los ratones tratados con ERY1-OVA exhibieron niveles de IgG sérica específica a OVA 39,8 veces más bajos 19 días después de la primera administración del antígeno (Figura 3). Esta aparente reducción en la activación de las células B, después de la ligadura a eritrocitos por el antígeno, corrobora las hipótesis actuales sobre la presentación de antígenos no inflamatorios durante la inducción de tolerancia (Miller, Turley, y otros, 2007; Green, Ferguson, y otros, 2009; Mueller, 2010).

Para validar aún más la inducción de la tolerancia inmunitaria específica al antígeno, el modelo de tolerancia a la estimulación OT-I se combinó con un modelo de injerto tumoral que expresa OVA (Figura 2i). Similar al diseño experimental anterior, los ratones se indujeron a tolerancia por dos administraciones intravenosas de 10  $\mu$ g de ERY1-OVA o 10  $\mu$ g de OVA después de la transferencia adoptiva de células T CD8<sup>+</sup> OT-I. Se detectó una eliminación marcada de células T 5 días después de la primera administración del antígeno, ya que los ratones inyectados con ERY1-OVA albergaban 2,9 veces menos células T CD8<sup>+</sup> OT-I no proliferantes (generación 0) en la sangre (Figura 2j). Para determinar la capacidad de respuesta funcional de las células T CD8<sup>+</sup> OT-I proliferantes en ausencia de un adyuvante fuerte administrado de forma exógena, las células de timoma EL-4 que expresan OVA (E.G7-OVA) se inyectaron por vía intradérmica en la piel de los ratones 9 días después de la transferencia adoptiva. Para evaluar la eficacia tolerogénica del antígeno unido a los eritrocitos, los ratones portadores de tumor se estimularon con OVA con adyuvante con LPS 6 días después del injerto del tumor, de forma análoga a la dosis y al esquema del modelo de tolerancia a la estimulación. Se observó un crecimiento tumoral robusto de forma continua en los ratones tratados con ERY1-OVA en comparación con los ratones de control no tratados o los tratados con OVA hasta 8 días después del injerto del tumor (Figura 2k), lo que confirma que la proliferación de la célula T CD8<sup>+</sup> OT-I dirigida por ERY1-OVA indujo la falta de capacidad de respuesta inmunitaria funcional a OVA. Que el tamaño del tumor se detuviera a un estado estable 8 días después del injerto puede ser indicativo de células T CD8<sup>+</sup> OT-I residuales que aún no se habían sometido a la tolerancia a la eliminación dirigida por ERY1-OVA.

#### Animales

Las autoridades veterinarias suizas aprobaron previamente todos los procedimientos con animales. Se usaron ratones hembra C57BL/6 de 8-12 semanas de edad (Charles River) para los estudios *in vivo* de unión y como hospedadores tumorales de E.G7-OVA. Se criaron ratones C57BL/6-Tg (Tcratcrb) 1100Mjb (OT-I) (Jackson Labs) en el EPFL Animal Facility, y se usaron hembras para el aislamiento de los esplenocitos a las 6-12 semanas de edad. Se usaron ratones hembra B6.SJL-*Ptprc<sup>a</sup>Pepc<sup>b</sup>*/Boy (CD45.1) de 8-12 semanas de edad (Charles River) como hospederos receptores para la transferencia adoptiva de células T CD8<sup>+</sup> OT-I y los estudios de inducción de tolerancia.

#### Diseño y síntesis de péptidos

El péptido ERY1 (H<sub>2</sub>N-WMVLPWLPGLDGGSGCRG-CONH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO:19) y el péptido no compatible (H<sub>2</sub>N-PLLTVGMDLWPWGGSGCRG-CONH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO:20) se sintetizaron mediante el uso de la química estándar f-moc en fase sólida mediante el uso de resina TGR (Nova Biochem) en un manipulador automático de líquidos (CHEMSPEED).

La secuencia subrayada es la secuencia ERY1 12-mer que descubrimos previamente mediante la presentación en fagos como un elemento que se une a la glicoforina-A de ratón (Kontos y Hubbell, 2010). La región GGSG sirvió como un conector para el residuo de cisteína usado para la conjugación; el residuo de arginina flanqueante sirvió para disminuir el pKa y así aumentar la reactividad del residuo de cisteína (Lutolf, Tirelli, y otros, 2001). El péptido se escindió de la resina durante 3 h en 95 % de ácido trifluoroacético, 2,5 % de etanodiol, 2,5 % de agua y se precipitó en éter dietílico helado. La purificación se realizó en una HPLC-MS preparativa (Waters) mediante el uso de una columna de fase inversa C18 (PerSpective Biosystems).

#### Conjugación antígeno-ERY1

Se hicieron reaccionar 10 equivalentes molares de succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC, CAS# 64987-85-5, Thermo Scientific) disueltos en dimetilformamida con 5 mg/ml de OVA libre de endotoxinas (<1 UE/mg) (Hyglos GmbH) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de desalar en una columna de centrifugación ZEBRA Desalt de 2 ml (Thermo Scientific), se añadieron 10 equivalentes de péptido ERY1 o MIS disueltos en guanidina-HCl 3 M y se dejó reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. El conjugado se desaló mediante el uso de columnas de centrifugación ZEBRA Desalt de 2 ml, se filtraron estériles 0,2 µm, se dispensaron en alícuotas de trabajo y se almacenaron a -20 °C. La concentración de proteínas se determinó mediante BCA Assay (Thermo Scientific). El esquema da como resultado la conjugación de la cadena lateral de cisteína en el péptido con las cadenas laterales de lisina en el antígeno. La glutatión-S-transferasa (GST) se expresó en *Escherichia coli* BL21 y se purificó mediante el uso de cromatografía de afinidad estándar con glutatión. La eliminación de las endotoxinas en la columna se realizó mediante un lavado exhaustivo con Triton-X114 (Sigma Aldrich), y la eliminación de las endotoxinas se confirmó con células THP-1X Blue (InvivoGen). Se usó el mismo procedimiento de reacción para conjugar ERY1 con GST. La alofocianina activada con maleimida (Innova Biosciences) se disolvió en PBS y se conjugó con ERY1 o MIS como se describió anteriormente.

#### Microscopía de unión a los eritrocitos

Se expusieron  $5 \times 10^5$  eritrocitos recién aislados de ratón a 100 nM de ERY1-OVA u OVA en PBS que contenía 10 mg/ml de BSA durante 1 hora a 37 °C. Después de la centrifugación y el lavado, las células se marcaron con 1:200 de anti-glicoforina-A de ratón obtenido en cabra diluida (Santa Cruz) y anti-OVA obtenido en conejo (AbD SEROTEC) durante 20 minutos en hielo. Después de la centrifugación y el lavado, las células se marcaron con 1:200 anti-IgG de cabra ALEXAFLUOR488 (Invitrogen) y anti-IgG de conejo AlexaFluor546 (Invitrogen) durante 20 minutos en hielo. Después de un ciclo final de centrifugado/lavado, las células se montaron de manera rígida y se tomaron imágenes en un microscopio confocal invertido Zeiss LSM700 con un objetivo de inmersión en aceite de 63x. El análisis de la imagen se realizó en IMAGEJ (NIH), con un procesamiento idéntico a ambas imágenes.

#### Unión in vivo y biodistribución

Se inyectaron 150 µg de ERY1-OVA u OVA en solución salina al 0,9 % (B. Braun) en un volumen de 100 µl por vía intravenosa en la cola de ratones hembra C57BL/6 de 8-12 semanas de edad bajo anestesia con isoflurano. Se tuvo cuidado para asegurar que los ratones se mantuvieran a 37 °C con una almohadilla térmica durante la experimentación. En momentos predeterminados, se tomaron 5 µl de sangre de una pequeña incisión en la cola, se diluyó 100 veces en EDTA 10 mM en PBS, se lavó tres veces con PBS con 10 mg/ml de BSA y se analizó el contenido de OVA mediante citometría de flujo y ELISA. El OVA se cuantificó por ELISA tipo sándwich, mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-OVA (Sigma) para la captura, un anticuerpo policlonal anti-OVA obtenido en conejo (AbD SEROTEC) para la detección, un anticuerpo anti-IgG de conejo-HRP obtenido en cabra (BioRad) para la detección final, seguido de sustrato TMB (GE Life Sciences). La caracterización hematológica se realizó en ADVIVA 2120 Hematology System (Siemens). ERY1-GST unido a los eritrocitos se detectó mediante la incubación de células marcadas con anti-GST obtenido en cabra (GE Healthcare Life Sciences), seguido de la incubación con anti-cabra obtenido en burro AlexaFluor488 (Invitrogen), y se analizó por citometría de flujo. Para los estudios de biodistribución, se inyectaron 20 µg de ERY1-APC o MIS-APC por vía intravenosa en la vena de la cola de ratones hembra C57BL/6 de 8-12 semanas de edad como se describió anteriormente. Los ratones se sacrificaron en momentos predeterminados, y se extrajeron el bazo, la sangre y el hígado. Cada órgano se digirió con colagenasa D (Roche) y se homogeneizó para obtener una suspensión unicelular para la tinción por citometría de flujo.

#### Transferencia adoptiva de células T

Las células T CD8<sup>+</sup> de bazo de ratón OT-I (CD45.2<sup>+</sup>) se aislaron mediante el uso de un kit de selección negativa de perlas magnéticas CD8 (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante. Las células CD8<sup>+</sup> OT-I recién aisladas se resuspendieron en PBS y se marcaron con éster succinimidil carboxifluoresceína 1 µM (CFSE, Invitrogen) durante 6 minutos a temperatura ambiente, y la reacción se inactivó durante 1 minuto con un volumen igual de IMDM con FBS al 10 % (Gibco). Las células se lavaron, se contaron y se resuspendieron en IMDM puro antes de la inyección. Se inyectaron  $3 \times 10^6$  células CD8<sup>+</sup> OT-I marcadas con CFSE por vía intravenosa en la vena de la cola de los ratones receptores CD45.1<sup>+</sup>. Para los estudios de proliferación a corto plazo, se inyectaron 10 µg de ERY1-OVA u OVA en un volumen de 100 µl 24 h después de la transferencia adoptiva. Los esplenocitos se cultivaron 5 días después de la administración del antígeno y se tiñeron para el análisis por citometría de flujo.

## Modelo de estimulación y tolerancia OT-I

Se inyectaron  $3 \times 10^5$  células T CD8<sup>+</sup> OT-I marcadas con CFSE en ratones receptores CD45.1<sup>+</sup> como se describe anteriormente. A los ratones se les administraron por vía intravenosa 10 µg de ERY1-OVA u OVA en 100 µl de solución salina en la vena de la cola, 1 y 6 días después de la transferencia adoptiva. Los ratones se estimularon con 5 µg de OVA y 25 ng de LPS de *Escherichia coli* ultrapuro (InvivoGen) en 25 µl por vía intradérmica en cada almohadilla de la pata trasera (método Hock, dosis total de 10 µg de OVA y 50 ng de LPS), 15 días después de la transferencia adoptiva. Los ratones se sacrificaron 4 días después de la estimulación, y se aislaron las células de los ganglios linfáticos de drenaje y del bazo para la reestimulación. Para el análisis por citometría de flujo de las citocinas intracelulares, las células se reestimularon en presencia de 1 mg/ml de OVA o 1 µg/ml de péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 3) (Genscript) durante 3 h. Se añadió Brefeldin-A (Sigma, 5 µg/ml) y se reanudó la reestimulación durante 3 h adicionales antes de la tinción y el análisis por citometría de flujo. Para las mediciones por ELISA de los factores secretados, las células se reestimularon en presencia de 100 µg/ml de OVA o 1 µg/ml del péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 3) durante 4 días. Las células se centrifugaron y los medios se recogieron para el análisis por ELISA mediante el uso de los kits Ready-Set-Go de IFNγ e IL-10 (eBiosciences) según las instrucciones del fabricante. Se detectó IgG sérica específica a OVA mediante la incubación del suero de ratón a diluciones variables en placas recubiertas con OVA, seguido de una incubación final con anti-IgG de ratón-HRP obtenido en cabra (Southern Biotech).

## Modelo de tolerancia OT-I.E.G7-OVA

Se inyectaron  $1 \times 10^6$  células T CD8<sup>+</sup> OT-I marcadas con CFSE en ratones hembra C57BL/6 de 8-12 semanas de edad como se describió anteriormente. A los ratones se les administraron por vía intravenosa 10 µg de ERY1-OVA o 10 µg de OVA en 100 µl de solución salina en la vena de la cola, 1 y 6 días después de la transferencia adoptiva. Se extrajo sangre 5 días después de la transferencia adoptiva para la caracterización de la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> OT-I por citometría de flujo. Las células de timoma EL-4 que expresan OVA (E.G7-OVA, ATCC CRL-2113) se cultivaron según las directrices de ATCC. En resumen, las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10 %, HEPES 10 mM, piruvato sódico 1 mM, β-mercaptoetanol 0,05 mM, puromicina/estreptomicina al 1 % (Invitrogen Gibco) y G418 0,4 mg/ml (Laboratorios PAA). Justo antes de la inyección, las células se expandieron en medios sin G418 y se resuspendieron tras el cultivo en HBSS (Gibco). Los ratones se anestesiaron con isoflurano, se afeitó el área de la espalda y se inyectaron  $1 \times 10^6$  células de E.G7-OVA por vía intradérmica entre los omóplatos 9 días después de la transferencia adoptiva. Las dimensiones del tumor se midieron cada 24 h, 4 días después del injerto de E.G7-OVA, con un calibrador digital y el volumen del tumor se calculó como un elipsoide ( $V = (\pi/6) l \cdot w \cdot h$ ), donde  $V$  es el volumen  $l$  es la longitud  $w$  es el ancho, y  $h$  es la altura del tumor. Los ratones se estimularon con 5 µg de OVA y 25 ng de LPS de *Escherichia coli* ultrapuro (InvivoGen) en 25 µl por vía intradérmica en cada almohadilla de la pata delantera (dosis total de 10 µg de OVA y 50 ng de LPS) 15 días después de la transferencia adoptiva.

## Anticuerpos y citometría de flujo

Los siguientes anticuerpos anti-ratón se usaron para la citometría de flujo: CD1d Pacific Blue, CD3ε PerCP-Cy5.5, CD8α PE-Cy7, CD11b PE-Cy7, CD11c Pacific Blue, CD45 biotinilado, CD45.2 Pacific Blue, CD45 Pacific Blue, IFNγ-APC, CD8α APC-eF780, CD44 PE-Cy5.5, CD62L PE, CD205 PE-Cy7, F4/80 PE, I-A/I-E MHCII FITC (todos de eBioscience), además de la tinción fijable vivo/muerto (Invitrogen), kit de marcaje de anexina-V-Cy5 (BioVision), estreptavidina Pacific Orange (Invitrogen) y anti-OVA-FITC (Abcam). Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo CyAn ADP (Beckman Coulter). Las células se lavaron primero con PBS, se tiñeron durante 20 minutos en hielo con tinción vivo/muerto, se bloquearon durante 20 minutos en hielo con medio de hibridoma 24G2, se tiñeron las superficies durante 20 minutos en hielo, se fijaron en paraformaldehído al 2 % durante 20 minutos en hielo, se tiñeron intracelularmente en presencia de saponina al 0,5 % durante 45 minutos en hielo, seguido de un lavado final antes del análisis. Para la tinción de apoptosis, se añadió anexina-V-Cy5 por 5 minutos antes del análisis. Para la tinción de CD45, las células se tiñeron con estreptavidina Pacific Orange durante 20 minutos en hielo, se lavaron y se analizaron.

## Implementación con partículas

El péptido ERY1 también se ha implementado para la tolerogénesis en forma de nanopartículas, a las que se conjugan el péptido ERY1 y el antígeno tolerogénico.

Para formar los conjugados de ERY1 con una nanopartícula polimérica, que también se conjuga con el péptido o el antígeno proteico, pueden añadirse cantidades estequiométricas de cada componente consecutivamente para controlar las conversiones de conjugación. Para formar una nanopartícula conjugada con OVA y ERY1 o el péptido no compatible, los péptidos se disolvieron primero en HCl de guanidina acuoso 3 M, y se añadieron 0,5 equivalentes a las nanopartículas que contienen un grupo piridildisulfuro reactivo con tiol. Se tomaron mediciones de absorbancia a 343 nm para controlar la conversión de la reacción, ya que la reacción genera una especie de piridina-2-tiona no reactiva con una alta absorbancia a esta longitud de onda. Después de 2 h a temperatura ambiente, la absorbancia a 343 nm se estabilizó y la OVA se disolvió en HCl de guanidina acuoso 3 M, y se añadió a la solución de nanopartículas con un exceso molar de 2 veces. Después de 2 h a temperatura ambiente, la absorbancia a 343 nm se estabilizó una vez más a un valor más alto, y se calcularon las concentraciones tanto del péptido como de la OVA en la solución. Las nanopartículas bifuncionalizadas se purificaron a partir de los componentes que no reaccionaron por filtración en gel en una columna empaquetada con

Sepharose CL6B. Cada fracción de 0,5 ml se analizó para detectar la presencia de proteínas y/o péptidos mediante fluorescamina, y el tamaño de las nanopartículas se evaluó mediante la dispersión dinámica de la luz (DLS).

Si el antígeno no contiene ningún grupo tiol libre para realizar dicha reacción, puede introducirse mediante tecnología de ADN recombinante para generar un mutante que luego podría expresarse y purificarse de forma recombinante. Alternativamente, la reticulación del ácido amina-carboxílico podría realizarse entre la nanopartícula y el antígeno mediante el uso de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC).

Para formar los conjugados de ERY1 con una micela polimérica, que también se conjuga con el péptido o el antígeno proteico, se usarían reacciones similares a las descritas con las nanopartículas poliméricas. La micela se formaría para contener los grupos funcionales deseados para el esquema de conjugación apropiado. Dado que nuestras nanopartículas y micelas pueden sintetizarse para contener muchas funcionalizaciones de grupos químicos diferentes, existen numerosas posibilidades de esquemas de conjugación para generar el complejo de nanopartícula/micela-antígeno-ERY1.

Ejemplo 4: Desarrollo de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con los que se unen eritrocitos de ratón y/o humanos

Como otro método para unirse de forma no covalente a los eritrocitos, también puede usarse un anticuerpo de unión a los eritrocitos para inducir tolerancia inmunológica específica al antígeno. Los anticuerpos que muestran una alta afinidad hacia las proteínas de la superficie de los eritrocitos pueden aislarse mediante la selección de bibliotecas de anticuerpos mediante el uso de plataformas de presentación de última generación, que incluyen, pero no se limitan a, presentación en bacteriófagos, presentación en la superficie de levaduras y *E. coli*. Tras el descubrimiento del nuevo anticuerpo de unión a los eritrocitos, puede evaluarse una caracterización bioquímica de unión similar a la realizada con el péptido ERY1. Para generar mutantes de mayor afinidad con características de unión mejoradas, se lleva a cabo la maduración de la afinidad en los fragmentos de anticuerpos descubiertos para unirse a los eritrocitos a partir de la selección inicial de la biblioteca. Mediante el uso de técnicas estándar de ADN recombinante, como PCR propensa a errores y mutagénesis dirigida al sitio, se genera una nueva biblioteca a partir de la secuencia de unión original. La biblioteca de maduración de la afinidad se muestra mediante el uso de plataformas de presentación de última generación, como se describió anteriormente, para otros fragmentos de anticuerpos con afinidad mejorada para los eritrocitos en comparación con la secuencia de unión original.

La maduración de la afinidad también se realiza en anticuerpos existentes que se unen a los eritrocitos de ratón o a los eritrocitos humanos. El anticuerpo del clon monoclonal de rata TER-119 (Kina y otros, Br J Haematol, 2000) se une a los eritrocitos de ratón en un sitio aún por determinar, pero su especificidad ha llevado a su uso común en la eliminación de los eritrocitos de las poblaciones celulares heterogéneas. La maduración de la afinidad se realiza en el anticuerpo TER-119, ya sea como un anticuerpo de longitud completa o como un fragmento de anticuerpo tal como un scFv, para descubrir nuevos anticuerpos con mayor afinidad hacia los eritrocitos de ratón. El anticuerpo clon monoclonal 10F7 de ratón (Langlois y otros, J Immunol 1984) se une a la glicoforina-A humana en la superficie celular de los eritrocitos humanos. La maduración de la afinidad se realiza en el anticuerpo 10F7, ya sea como un anticuerpo de longitud completa o como un fragmento de anticuerpo tal como un scFv, para descubrir nuevos anticuerpos con mayor afinidad hacia los eritrocitos humanos.

Para determinar la secuencia primaria del anticuerpo TER-119, clonamos el ADNc aislado específico del anticuerpo del hibridoma TER-119 en un plásmido que permite una secuenciación fácil de los fragmentos de los genes. Se usó un conjunto específico de cebadores para el proceso de amplificación por PCR de los genes de los anticuerpos que permite la amplificación de los múltiples dominios variables de los segmentos de los genes (Krebber y otros, 1997; Reddy y otros, 2010). La secuencia de ADN de los dominios de los anticuerpos nos permitió determinar las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo IgG TER-119. Para construir una versión scFv de la IgG TER-119, usamos PCR de ensamblaje para generar un gen que comprende la cadena pesada variable de TER-119, seguido de un conector (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 18), seguido de la cadena ligera variable de TER-119.

La PCR de transcriptasa inversa estándar (RT-PCR) se realizó en ARNm del clon del hibridoma TER-119 mediante el uso del Superscript III First Strand Synthesis System (Invitrogen) (Invitrogen) para generar el ADN complementario (ADNc) del clon. Luego se realizó la PCR mediante el uso del siguiente conjunto de cebadores para amplificar específicamente las secuencias de ADN de las regiones variable pesada (VH) y variable ligera (VL) del anticuerpo:

ES 2 781 773 T3

|    | Nombre del Cebador | Secuencia del cebador (5' a 3')                      | SEQ ID NO    |
|----|--------------------|------------------------------------------------------|--------------|
| 5  | VL-FOR1            | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TCC AGC TGA CTC AGC<br>C     | SEQ ID NO:21 |
|    | VL-FOR2            | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TTC TCW CCC AGT<br>C     | SEQ ID NO:22 |
| 10 | VL-FOR3            | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGM TMA CTC AGT<br>C     | SEQ ID NO:23 |
|    | VL-FOR4            | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGY TRA CAC AGT<br>C     | SEQ ID NO:24 |
| 15 | VL-FOR5            | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TRA TGA CMC AGT<br>C     | SEQ ID NO:25 |
|    | VL-FOR6            | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTM AGA TRA MCC<br>AGT C     | SEQ ID NO:26 |
| 20 | VL-FOR7            | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTC AGA TGA YDC AGT<br>C     | SEQ ID NO:27 |
|    | VL-FOR8            | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TYC AGA TGA CAC<br>AGA C     | SEQ ID NO:28 |
| 25 | VL-FOR9            | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TTC TCA WCC AGT<br>C     | SEQ ID NO:29 |
|    | VL-FOR10           | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG WGC TSA CCC AAT<br>C     | SEQ ID NO:30 |
| 30 | VL-FOR11           | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTS TRA TGA CCC ART<br>C     | SEQ ID NO:31 |
|    | VL-FOR12           | AGC CGG CCA TGG CGG AYR TTK TGA TGA CCC ARA<br>C     | SEQ ID NO:32 |
| 35 | VL-FOR13           | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CBC AGK<br>C     | SEQ ID NO:33 |
|    | VL-FOR14           | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TAA CYC AGG<br>A     | SEQ ID NO:34 |
| 40 | VL-FOR15           | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CCC<br>AGW T     | SEQ ID NO:35 |
| 45 | VL-FOR16           | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CAC AAC<br>C     | SEQ ID NO:36 |
|    | VL-FOR17           | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTT TGC TGA CTC AGT<br>C     | SEQ ID NO:37 |
| 50 | VL-FOR18           | AGC CGG CCA TGG CGG ARG CTG TTG TGA CTC AGG<br>AAT C | SEQ ID NO:38 |
|    | VL-REV1            | GAT GGT GCG GCC GCA GTA CGT TTG ATT TCC AGC<br>TTG G | SEQ ID NO:39 |
| 55 | VL-REV2            | GAT GGT GCG GCC GCA GTA CGT TTT ATT TCC AGC<br>TTG G | SEQ ID NO:40 |
|    | VL-REV3            | GAT GGT GCG GCC GCA GTA CGT TTT ATT TCC AAC<br>TTT G | SEQ ID NO:41 |
| 60 | VL-REV4            | GAT GGT GCG GCC GCA GTA CGT TTC AGC TCC AGC<br>TTG G | SEQ ID NO:42 |
| 65 | VL-REV5            | GAT GGT GCG GCC GCA GTA CCT AGG ACA GTC AGT<br>TTG G | SEQ ID NO:43 |

ES 2 781 773 T3

|    | Nombre del Cebador | Secuencia del cebador (5' a 3')                                        | SEQ ID NO    |
|----|--------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 5  | VL-REV6            | GAT GGT GCG GCC GCA GTA CCT AGG ACA GTG ACC TTG G                      | SEQ ID NO:44 |
|    | VH-FOR1            | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA KGT RMA GCT TCA GGA GTC    | SEQ ID NO:45 |
| 10 | VH-FOR2            | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT BCA GCT BCA GCA GTC    | SEQ ID NO:46 |
|    | VH-FOR3            | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT GCA GCT GAA GSA STC    | SEQ ID NO:47 |
| 15 | VH-FOR4            | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT CCA RCT GCA ACA RTC    | SEQ ID NO:48 |
|    | VH-FOR5            | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT YCA GCT BCA GCA RTC    | SEQ ID NO:49 |
| 20 | VH-FOR6            | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT YCA RCT GCA GCA GTC    | SEQ ID NO:50 |
|    | VH-FOR7            | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT CCA CGT GAA GCA GTC    | SEQ ID NO:51 |
| 25 | VH-FOR8            | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA SST GGT GGA ATC    | SEQ ID NO:52 |
|    | VH-FOR9            | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA VGT GAW GYT GGT GGA GTC    | SEQ ID NO:53 |
| 30 | VH-FOR10           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GCA GSK GGT GGA GTC    | SEQ ID NO:54 |
|    | VH-FOR11           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA KGT GCA MCT GGT GGA GTC    | SEQ ID NO:55 |
| 35 | VH-FOR12           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA GCT GAT GGA RTC    | SEQ ID NO:56 |
|    | VH-FOR13           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GCA RCT TGT TGA GTC    | SEQ ID NO:57 |
| 40 | VH-FOR14           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA RGT RAA GCT TCT CGA GTC    | SEQ ID NO:58 |
| 45 | VH-FOR15           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA AGT GAA RST TGA GGA GTC    | SEQ ID NO:59 |
|    | VH-FOR16           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT TAC TCT RAA AGW GTS TG | SEQ ID NO:60 |
| 50 | VH-FOR17           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT CCA ACT VCA GCA RCC    | SEQ ID NO:61 |
|    | VH-FOR18           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA TGT GAA CTT GGA AGT GTC    | SEQ ID NO:62 |
| 55 | VH-FOR19           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA GGT CAT CGA GTC    | SEQ ID NO:63 |
|    | VH-REV1            | CCC TTG AAG CTT GCT GAG GAA ACG GTG ACC GTG GT                         | SEQ ID NO:64 |
| 60 | VH-REV2            | CCC TTG AAG CTT GCT GAG GAG ACT GTG AGA GTG GT                         | SEQ ID NO:65 |

| Nombre del Cebador | Secuencia del cebador (5' a 3')                | SEQ ID NO    |
|--------------------|------------------------------------------------|--------------|
| VH-REV3            | CCC TTG AAG CTT GCT GCA GAG ACA GTG ACC AGA GT | SEQ ID NO:66 |
| VH-REV4            | CCC TTG AAG CTT GCT GAG GAG ACG GTG ACT GAG GT | SEQ ID NO:67 |

Los genes amplificados de VH y VL se digirieron luego con endonucleasas de restricción (NcoI y NotI para VL, NdeI y HindIII para VH), los fragmentos de los genes se purificaron después de la electroforesis en agarosa mediante el uso de un kit estándar (Zymo Research, Orange, CA, Estados Unidos), y se ligaron en un plásmido de clonación pMAZ360. El plásmido que contiene el gen de VH o VL se secuenció, y se construyó un nuevo gen mediante el uso de PCR de ensamblaje para generar la secuencia scFv TER-119:

5'-GAGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGGGGGTCTC  
 TGAAACTCTCCTGTGTAGCCTCAGGATTCACTTTCAGGGACCACTGGATGAATTG  
 GGTCCGGCAGGCTCCCGGAAAGACCATGGAGTGGATTGGAGATATTAGACCTGA  
 TGGCAGTGACACAACTATGCACCATCTGTGAGGAATAGATTACAACTCTCCAG  
 AGACAATGCCAGGAGCATCCTGTACCTGCAGATGAGCAATATGAGATCTGATTA  
 CACAGCCACTTATTACTGTGTTAGAGACTCACCTACCCGGGCTGGGCTTATGGAT  
 GCCTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACTGTCTCCTCAGCCGGTGGTGGTGGTTCTG  
 GTGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGACATTCAGAT  
 GACGCAGTCTCCTTCAGTCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACTCTCAAC  
 TGCAAAGCAAGTCAGAATATTAACAAGTACTTAACTGGTATCAGCAAAAGCTT  
 GGAGAAGCTCCCAAAGTCTGATATATAATAACAAACAATTTGCAAACGGGCATC  
 CCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCACCATCAGTA  
 GCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCCACATATTTCTGCTTTCAGCATTATACTTGGCCC  
 ACGTTTGGAGGTGGGACCAAGCTGGAAATCAAACGTACT-3' (SEQ ID NO:69),

que codifica para la región VH del clon TER-119 en el N-terminal de la proteína traducida, seguido de un dominio conector (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 18), seguido de la región VL del clon TER-119 en el C-terminal de la proteína traducida. El gen scFv TER-119 se construyó por amplificación del ADNc de TER-119 con los cebadores SK07 y SK08, específicos para la región VH, y SK09 y SK10, específicos para la región VL:

| Nombre del Cebador | Secuencia del cebador (5' a 3')                                                        | SEQ ID NO      |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| SK07               | ACT CGC GGC CCA GCC GGC CAT GGC GGA GGT GAA GCT GCA GGA GTC                            | SEQ ID NO:70   |
| SK08               | GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC ACC GGC TGA GGA GAC AGT GAC TG | SEQ ID NO:71   |
| SK09               | GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGA TCC GAC ATT CAG ATGACGCAGTC                        | SEQ ID NO:7972 |
| SK10               | GAC TAC TAG GCC CCC GAG GCC AGT ACG TTT GAT TTC CAG CT                                 | SEQ ID NO:73   |

Cada producto final completo del gen scFv se digirió con SfiI y XhoI (NEB, Ipswich, MA, Estados Unidos) y se ligó a los mismos sitios en el plásmido de expresión de mamífero pSecTagA (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

Para madurar por afinidad el scFv 10F7 que se une a la glicoforina-A humana, el gen se sintetizó comercialmente y se obtuvo de DNA2.0 (Menlo Park, CA, Estados Unidos) como la siguiente secuencia:

5'-GTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGGCGCAGGTGAAACTGCAGCAG  
AGCGGCGCGGAAGTGGTGAACCGGGCGCGAGCGTGAAACTGAGCTGCAAAGC  
10 GAGCGGCTATACCTTTAACAGCTATTTTATGCATTGGATGAAACAGCGCCCGGTG  
CAGGGCCTGGAATGGATTGGCATGATTCGCCCCAACGGCGGCACCAACGATTAT  
AACGAAAAATTTAAAAACAAAGCGACCCTGACCGTGGATAAAAGCAGCAACACC  
15 GCGTATATGCAGCTGAACAGCCTGACCAGCGGCGATAGCGCGGTGTATTATTGC  
GCGCGCTGGGAAGGCAGCTATTATGCGCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCACC  
GTGACCGTGAGCAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG  
20 CGGCAGCGATATTGAACTGACCCAGAGCCCGGCGATTATGAGCGCGACCCCTGGG  
CGAAAAAGTGACCATGACCTGCCGCGCGAGCAGCAACGTGAAATATATGTATTG  
25 GTATCAGCAGAAAAGCGGCGCGAGCCCGAAACTGTGGATTTATTATACCAGCAA  
CCTGGCGAGCGGCGTGCCGGGGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCAGCTA  
TAGCCTGACCATTAGCAGCGTGGAAGCGGAAGATGCGGCGACCTATTATTGCCA  
30 GCAGTTTACCAGCAGCCCGTATACCTTTGGCGGCGGCACCAAAGTGAATTA  
ACGCGCGGCGGCGGCGCCTCGGGGGCCGAGGGCGGCGGTTCT-3' (SEQ ID NO:74).

Se realiza una maduración de la afinidad similar mediante el uso de las técnicas de ADN recombinante descritas anteriormente para TER-119 en el gen 10F7 para obtener una biblioteca de mutantes para permitir la selección de una unión mejorada hacia los eritrocitos humanos.

Ejemplo 5: Inducción de la tolerancia inmunológica específica al antígeno a través de la unión no covalente a los eritrocitos con el antígeno conjugado con el anticuerpo

El anticuerpo puede conjugarse con el antígeno mediante el uso de reacciones de reticulación estándar como se menciona en el Ejemplo 3 y en otra parte en la presente descripción. El conjugado de anticuerpo-antígeno purificado exhibirá inducción de tolerancia hacia el antígeno en modelos estándar de ratón de diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, trasplante de islotes y antígeno modelo OVA.

Para demostrar la inducción de tolerancia hacia OVA, el conjugado de OVA-anticuerpo o el conjugado de OVA-nanopartícula-anticuerpo puede administrarse por vía intravenosa o extravascular a los ratones. En un número predeterminado de días después de la administración, se sacrificarán los ratones y se recolectarán los ganglios linfáticos, el bazo y la sangre para su análisis. Los esplenocitos y las células derivadas de los ganglios linfáticos se colocan en placas y se reestiman durante 3 días *ex vivo* con OVA y/o péptido SIINFEKL, y se miden por ELISA la regulación negativa de la expresión de IFN $\gamma$ , IL-17a, IL-2 e IL-4, y la regulación positiva de TGF- $\beta$ 1, que son pruebas establecidas de tolerancia. La tinción intracelular de IFN $\gamma$ , IL-17a, IL-2 e IL-4 se realiza mediante el uso de la citometría de flujo en los esplenocitos y las células derivadas de los ganglios linfáticos después de 6 h de reestimulación *ex vivo* con OVA y/o péptido SIINFEKL. Además, la citometría de flujo se usa para caracterizar los perfiles de expresión de CD4, CD8 y las células T reguladoras de los ganglios linfáticos, el bazo y las células derivadas de la sangre. Además, se toman muestras de sangre de ratones en diferentes momentos para medir las respuestas de anticuerpos humorales hacia el antígeno OVA. Un experimento variante de la reestimulación *ex vivo* se realiza para determinar si se ha establecido la tolerancia sistémica. Los ratones se administran con el conjugado de OVA-anticuerpo o el conjugado de OVA-anticuerpo-nanopartícula como se describió anteriormente, OVA se vuelve a administrar 9 días después con un adyuvante (lipopolisacárido, adyuvante completo de Freud, alumbre u otro), y la capacidad de respuesta de los esplenocitos al antígeno OVA se evalúa por ELISA y/o citometría de flujo como se describió anteriormente. El conjugado de OVA-anticuerpo y/o la formulación de OVA-anticuerpo-nanopartícula hará que los esplenocitos no respondan a la segunda estimulación con OVA y el adyuvante, que es un método para demostrar el establecimiento efectivo de la tolerancia sistémica. Después de la administración inicial con el conjugado de OVA-anticuerpo y/o las formulaciones de OVA-anticuerpo-nanopartícula, pueden realizarse experimentos de estimulación *in vivo* con líneas celulares transgénicas como

una demostración adicional de tolerancia, tal como la transferencia adoptiva con células T OT-I, similar a los estudios descritos en detalle en el Ejemplo 3. Para demostrar la tolerancia inmunitaria en modelos de ratón de autoinmunidad o desinmunización de las moléculas terapéuticas, pueden hacerse conjugados de anticuerpos análogos a los antígenos relevantes como se describió en la presente descripción con OVA.

Ejemplo 6: Inducción de la tolerancia inmunológica específica al antígeno a través de la unión no covalente a los eritrocitos con el antígeno fusionado con el anticuerpo de cadena sencilla

Los fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) pueden usarse como elementos que se unen no covalentemente a los eritrocitos. Los scFv que muestran una alta afinidad hacia las proteínas de la superficie de los eritrocitos pueden aislarse mediante la selección de las bibliotecas scFv mediante el uso de plataformas de presentación de última generación. Tras el descubrimiento del nuevo fragmento de anticuerpo de unión a los eritrocitos, se debe evaluar una caracterización bioquímica similar de unión como se realizó con el péptido ERY1. Como el scFv tiene una cadena de polipéptidos, se fusionará con el antígeno de una manera recombinante específica del sitio mediante el uso de técnicas estándar de ADN recombinante. Dependiendo de la naturaleza de la pareja de la fusión con el antígeno, el scFv se fusiona con el N- o C-terminal del antígeno para generar la especie de proteína bifuncional. En el caso en que la secuencia de reconocimiento de péptidos del complejo de histocompatibilidad principal (MHC) se conoce para el antígeno, el péptido también se inserta en el dominio conector del scFv, generando así un nuevo constructo bifuncional de anticuerpo/antígeno que contiene los términos nativos del scFv.

Para demostrar la inducción de tolerancia hacia OVA, puede administrarse un conjugado de OVA-scFv u OVA-nanopartícula-scFv a los ratones por vía intravenosa o extravascular. En un número predeterminado de días después de la administración, los ratones deben sacrificarse y los ganglios linfáticos, el bazo y la sangre deben recolectarse para su análisis. Los esplenocitos y las células derivadas de los ganglios linfáticos se colocarán en placas y se estimularán nuevamente durante 3 días *ex vivo* con OVA y/o péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 3), y su regulación negativa de la expresión de IFN $\gamma$ , IL-17a, IL-2 e IL-4, y la regulación positiva de TGF- $\beta$ 1, que son evidencia establecida de tolerancia, deben medirse, por ejemplo, mediante ELISA. La tinción intracelular de IFN $\gamma$ , IL-17a, IL-2 e IL-4 se realiza mediante el uso de citometría de flujo en los esplenocitos y las células derivadas de los ganglios linfáticos después de 6 h de la reestimulación *ex vivo* con OVA y/o péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 3). Además, la citometría de flujo puede usarse para caracterizar los perfiles de expresión de CD4, CD8 y células T reguladoras de los ganglios linfáticos, bazo y células derivadas de la sangre. Además, se toman muestras de sangre de ratones en diferentes momentos para medir las respuestas de anticuerpos humorales hacia el antígeno OVA. Un experimento variante de la reestimulación *ex vivo* se realiza para determinar si se ha establecido la tolerancia sistémica. Los ratones se administran con el conjugado de OVA-scFv u OVA-nanopartícula-scFv como se describió anteriormente, OVA se vuelve a administrar 9 días después con un adyuvante (lipopolisacárido, adyuvante completo de Freud, alumbre u otro), y la capacidad de respuesta de los esplenocitos al antígeno OVA se evalúa por ELISA y/o citometría de flujo como se describió anteriormente. La formulación de OVA-scFv y/u OVA-scFv-nanopartícula hará que los esplenocitos no respondan a la segunda estimulación con la OVA y el adyuvante, lo que ilustra el establecimiento efectivo de la tolerancia sistémica. Después de la administración inicial con las formulaciones de OVA-scFv y/u OVA-scFv-nanopartícula, pueden realizarse experimentos de estimulación *in vivo* similares con líneas celulares transgénicas para demostrar la tolerancia, tal como la transferencia adoptiva con células T OT-I, similar a los estudios descritos en detalle en el Ejemplo 3. Para demostrar la tolerancia inmunitaria en modelos de ratón de autoinmunidad o desinmunización de las moléculas terapéuticas, pueden realizarse las fusiones análogas de scFv a los antígenos relevantes como se describió en la presente descripción con OVA.

Las técnicas estándar de ADN recombinante se usaron para generar un constructo de anticuerpos que se une a los eritrocitos de ratón y muestra el epítipo inmunodominante MHC-I de OVA (SGLEQLESIINFEKL) (SEQ ID NO: 75). Mediante el uso de PCR de extensión solapada, primero generamos un fragmento de ADN que codificaba para el dominio terminal 3', incluido el péptido SGLEQLESIINFEKL (SEQ ID NO: 75) con un dominio solapado 5' que es complementario al terminal 3' de la secuencia TER119. Este fragmento de ADN se usó como un cebador inverso, junto con un cebador 5' directo complementario, en una PCR estándar para generar el fragmento de ADN completo que codifica para TER119-SGLEQLESIINFEKL (SEQ ID NO: 75):

5'-GAGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGGGGGTCTCTG  
AAACTCTCCTGTGTAGCCTCAGGATTCACCTTCAGGGACCACTGGATGAATTGGG  
TCCGGCAGGCTCCCGGAAAGACCATGGAGTGGATTGGAGATATTAGACCTGATG  
GCAGTGACACAACTATGCACCATCTGTGAGGAATAGATTACAACTCTCCAGAG  
ACAATGCCAGGAGCATCCTGTACCTGCAGATGAGCAATATGAGATCTGATTACA  
CAGCCACTTATTACTGTGTTAGAGACTCACCTACCGGGCTGGGCTTATGGATGC  
CTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACTGTCTCCTCAGCCGGTGGTGGTCTGGT  
GGTGGTGGTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGACATTCAGATG  
ACGCAGTCTCCTTCAGTCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACTCTCAACT  
GCAAAGCAAGTCAGAAATTAACAAGTACTTAACTGGTATCAGCAAAAGCTTG  
GAGAAGCTCCCAAAGTCTGATATATAATAACAATTTGCAAACGGGCATCC  
CATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCACCATCAGTAG  
CTGCAGCCTGAAGATTTGCCACATTTCTGCTTTCAGCATTATACTTGGCCCA  
CGTTTGGAGGTGGGACCAAGCTGGAATCAAACGTAATCATCATCACCATCATGA  
CGGTGGCGGTCTGGCCTGGAGCAGCTGGAGTCTATTATTAATTTGAAAACTG-3' (SEQ ID NO: 76). La secuencia

subrayada denota el segmento génico que codifica para SGLEQLESIINFEKL. El fragmento de ADN se insertó en un vector de expresión de mamífero y procariota para la expresión recombinante.

Se usaron técnicas estándar de ADN recombinante para generar un constructo de anticuerpo que se une a los eritrocitos de ratón y muestra el mimotopo de cromogranina-A 1040-p31 (YVRPLWVRME) (SEQ ID NO: 77). Mediante el uso de la PCR de extensión solapada, se generó un fragmento de ADN que codificaba para el dominio terminal 3', incluido el péptido YVRPLWVRME (SEQ ID NO: 77) con un dominio solapado 5' que es complementario al terminal 3' de la secuencia TER119. Este fragmento de ADN se usó como un cebador, junto con un cebador 5' directo complementario, en una PCR estándar para generar el fragmento de ADN completo que codifica para TER119-YVRPLWVRME:

5'-

GAGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGGGGGTCTCTG  
AAACTCTCCTGTGTAGCCTCAGGATTCACCTTCAGGGACCACTGGATGAATTGGG  
TCCGGCAGGCTCCCGGAAAGACCATGGAGTGGATTGGGGATATTAGACCTGATG  
GCAGTGACACAACTATGCACCATCTGTGAGGAATAGATTCACAATCTCCAGAG  
ACAATACCAGGAGCATCCTGTACCTGCAGATGGGCAATATGAGATCTGATTACA  
CAGCCACTTATTACTGTGTTAGAGACTCACCTACCCGGGCTGGGCTTATGGATGC  
CTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACTGTCTCCTCAGCCGGTGGTGGTGGTTCTGGT  
GGTGGTGGTTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGACATTCAGATG  
ACGCAGTCTCCTTCAGTCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACTCTCAACT  
GCAAAGCAAGTCAGAATATTAACAAGTACTTAAACCGGTATCAGCAAAAGCTTG  
GAGAAGCTCCCAAAGTCCTGGTATATAATAACAACAATTTGCAAACGGGCATCC  
CATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGCACAGATTCACACTCACCATCAGTAG  
CCTGCAGCCTGAAGATTTTGCCACATATTTCTGCTTTCAGCATTATACTTGGCCCA  
CGTTTGGAGGTGTGACCAAGCTGGAAATCAAACGTACTCATCATCACCATCATCA

CGGTGGCGGTTATGTCAGACCTCTGTGGGTGAGAATGGAA-3' (SEQ ID NO: 78).

La secuencia subrayada denota el segmento de gen que codifica el mimotopo de cromogranina-A (1040-p31) (YVRPLWVRME) (SEQ ID NO: 77). El fragmento de ADN se insertó en un vector de expresión de mamífero y procariota para la expresión recombinante.

Las técnicas estándar de ADN recombinante se usaron para generar un constructo de anticuerpo que se une a los eritrocitos de ratón y muestra proinsulina de ratón, un autoantígeno de diabetes importante en el ratón NOD. Mediante el uso de PCR de extensión solapada, primero generamos un fragmento de ADN que codificaba para el dominio terminal 3', incluida la proteína de proinsulina completa, con un dominio solapado 5' que es complementario al terminal 3' de la secuencia TER119. Este fragmento de ADN se usó como un cebador, junto con un cebador 5' directo complementario, en una PCR estándar para generar el fragmento de ADN completo que codifica para TER119-proinsulina:

5'-GAGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGGGGGTCTCTG  
AAACTCTCCTGTGTAGCCTCAGGATTCACCTTCAGGGACCACTGGATGAATTGGG  
TCCGGCAGGCTCCCGGAAAGACCATGGAGTGGATTGGAGATATTAGACCTGATG  
GCAGTGACACAACTATGCACCATCTGTGAGGAATAGATTCACAATCTCCAGAG  
ACAATGCCAGGAGCATCCTGTACCTGCAGATGAGCAATATGAGATCTGATTACA  
CAGCCACTTATTACTGTGTTAGAGACTCACCTACCCGGGCTGGGCTTATGGATGC  
CTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACTGTCTCCTCAGCCGGTGGTGGTGGTTCTGGT  
GGTGGTGGTTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGACATTCAGATG  
ACGCAGTCTCCTTCAGTCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACTCTCAACT  
GCAAAGCAAGTCAGAATATTAACAAGTACTTAAACTGGTATCAGCAAAAGCTTG  
GAGAAGCTCCCAAAGTCCTGATATATAATAACAACAATTTGCAAACGGGCATCC  
CATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTCACACTCACCATCAGTAG  
CCTGCAGCCTGAAGATTTTGCCACATATTTCTGCTCTCAGCATTATACTTGGCCCA  
CGTTTGTGGTGGGACCAAGCTGGAAATCAAACGTACTCATCATCACCATCATCA  
CGGTGGCGGTTTTGTGAAACAGCATCTGTGCGGTCCGCATCTGGTGGAAGCGCTG  
TATCTGGTGTGCGGCGAACGTGGCTTTTTTATACCCCGAAAAGCCGTCGTGAAG  
TGGAAGATCCGCAGGTGGAACAGCTGGAACCTGGGCGGCAGCCCGGTGATCTGC  
AGACCCTGGCCCTGGAAGTGGCGCGTCAGAAACGTGGCATTGTGGATCAGTGCT

GCACCAGCATTTCGAGCCTGTATCAGCTGGAAAACTATTACAAC-3' (SEQ ID NO:79). La secuencia subrayada denota el segmento del gen de proinsulina del constructo. El fragmento de ADN se insertó en un vector de expresión de mamífero y procariota para la expresión recombinante.

5 Ejemplo 7: Síntesis de polímeros ramificados que comprenden ligandos de unión a los eritrocitos y otras funciones  
Para la síntesis de PEG-tioacetato de 8 brazos, se disolvió PEG-OH de 8 brazos (Nektar) en tolueno y se hizo reaccionar durante 18 h con 10 equivalentes de trietilamina (Sigma Aldrich, CAS# 121-44-8) y 10 equivalentes de cloruro de metanosulfonilo (Sigma Aldrich, CAS# 124-63-0) a temperatura ambiente bajo argón. El residuo se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida, se disolvió en dimetilformamida (DMF) y se añadió 10 equivalentes de tioacetato de potasio (Sigma Aldrich, CAS# 10387-40-3). Después de 18 h a temperatura ambiente, el residuo se filtró, el filtrado se concentró a presión reducida y se precipitó en éter dietílico. El precipitado se filtró y se secó a presión reducida para obtener el producto final.

15 Para la síntesis de PEG-piridildisulfuro de 8 brazos, se disolvió PEG-tioacetato de 8 brazos en dimetilformamida (DMF) y se desprotegió con 1,05 equivalentes de metóxido de sodio (Sigma Aldrich, CAS# 124-41-4) durante 1 hora a temperatura ambiente bajo argón en un tubo Schlenk. Para reducir los tioles desprotegidos a tiolatos, se añadieron a la solución 2 equivalentes de clorhidrato de Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, Thermo Scientific, CAS# 51805-45-9) y 2 equivalentes de agua destilada. Después de 2 h a temperatura ambiente, se añadieron 12 equivalentes de 2,2'-ditiopiridina (Aldrichiol-2, Sigma Aldrich, CAS# 2127-03-9) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla de reacción se dializó luego contra 5 l de agua destilada en un tubo de diálisis MWCO 3500 Da durante 48 h, durante las cuales el agua destilada se cambió 4 veces. La carga de piridildisulfuro en el PEG de 8 brazos se cuantificó por reducción en TCEP 25 mM en HEPES 100 mM, pH 8,0, y se midieron los espectros UV-vis a 343 nm para controlar la presencia del grupo saliente de piridina-2-tiona.

25 Para la síntesis de PEG-piridildisulfuro-ALEXAFLUOR647 de 8 brazos, se disolvió PEG-tioacetato de 8 brazos en DMF y se desprotegió con 1,05 equivalentes de metóxido de sodio (Sigma Aldrich, CAS# 124-41-4) durante 1 hora a temperatura ambiente bajo argón en un tubo Schlenk. Para reducir los tioles desprotegidos a tiolatos, se añadieron a la solución 2 equivalentes de clorhidrato de Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, Thermo Scientific, CAS# 51805-45-9) y un volumen igual de HEPES 100 mM, pH 8,0. Después de 2 h a temperatura ambiente, se añadieron 0,125 equivalentes (equivalente a 1 brazo de 8) de AlexaFluor647-C2-maleimida (Invitrogen). Después de 2 h a temperatura ambiente, se añadieron 12 equivalentes de 2,2'-ditiopiridina (Aldrichiol-2, Sigma Aldrich, CAS# 2127-03-9) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla de reacción se dializó luego contra 5 l de agua destilada en un tubo de diálisis MWCO 3500 Da durante 48 h, durante las cuales el agua destilada se cambió 4 veces. La carga de piridildisulfuro en el PEG de 8 brazos se cuantificó por reducción en TCEP 25 mM en HEPES 100 mM, pH 8,0, y se midieron los espectros UV-vis a 343 nm para controlar la presencia del grupo saliente de piridina-2-tiona.

40 Los péptidos que contienen tiol se conjugaron con el PEG-piridildisulfuro de 8 brazos mediante la adición de cantidades estequiométricas del péptido disuelto en 3 M acuoso de guanidina-HCl (Sigma Aldrich, CAS# 50-01-10), a la solución acuosa de PEG-piridildisulfuro de 8 brazos a temperatura ambiente. La conversión de la reacción se controló midiendo los espectros UV-vis a 343 nm para cuantificar la presencia del grupo saliente de piridina-2-tiona. Si se conjugara más de una molécula con el PEG-piridildisulfuro de 8 brazos, el procedimiento de reacción se repite con la nueva molécula en el mismo recipiente. Una vez que se completó la conjugación, la mezcla de reacción se desaló en una columna de desalación ZEBASPIN (Thermo Scientific), y el producto purificado se almacenó en las condiciones estériles apropiadas.

45 La inducción de tolerancia hacia OVA podría demostrarse para el conjugado de PEG-ERY1/MIS-SIINFELK de 8 brazos (SIINFELK: SEQ ID NO: 3) administrándolo por vía intravenosa o extravascular a los ratones. Esta prueba también indicaría la inducción de tolerancia en humanos mediante el uso de ligandos específicos de humanos. En tal demostración, un número predeterminado de días después de la administración, los ratones se sacrificarían y los ganglios linfáticos, el bazo y la sangre se extraerían para el análisis. Los esplenocitos y las células derivadas de los ganglios linfáticos se colocan en placas y se reestiman durante 3 días *ex vivo* con OVA y/o péptido SIINFELK (SEQ ID NO: 3), y su regulación negativa de la expresión de IFN $\gamma$ , IL-17a, IL-2 e IL-4, y la regulación positiva de TGF- $\beta$ 1, que son evidencia establecida de tolerancia, se miden por ELISA. La tinción intracelular de IFN $\gamma$ , IL-17a, IL-2 e IL-4 se realiza mediante el uso de la citometría de flujo en los esplenocitos y las células derivadas de los ganglios linfáticos después de 6 h de la reestimulación *ex vivo* con OVA y/o péptido SIINFELK (SEQ ID NO: 3). Además, la citometría de flujo se usa para caracterizar los perfiles de expresión de CD4, CD8 y las células T reguladoras de los ganglios linfáticos, el bazo y las células derivadas de la sangre. Además, se toman muestras de sangre de ratones en diferentes momentos para medir las respuestas de anticuerpos humorales hacia el antígeno OVA. Un experimento variante de la reestimulación *ex vivo* se realiza para determinar si se ha establecido la tolerancia sistémica. Los ratones se administran con conjugado de PEG-ERY1/MIS-SIINFELK de 8 brazos (SIINFELK: SEQ ID NO: 3) como se describió anteriormente, OVA se vuelve a administrar 9 días después con un adyuvante (lipopolisacárido, adyuvante completo de Freud, alumbre u otro), y la capacidad de respuesta de los esplenocitos al antígeno OVA se evalúa por ELISA y/o citometría de flujo como se describió anteriormente. La formulación del conjugado de PEG-ERY1-SIINFELK de 8 brazos (SIINFELK: SEQ ID NO: 3) hará que los esplenocitos no respondan a la segunda estimulación con la OVA y el adyuvante, que es un método para ilustrar el establecimiento efectivo de la tolerancia sistémica. Después de la administración inicial de las formulaciones del conjugado de PEG-ERY1/MIS-SIINFELK de 8 brazos (SIINFELK: SEQ ID NO: 3), se podrían realizar experimentos de estimulación *in vivo* similares con líneas celulares transgénicas para demostrar aún más la tolerancia, tal como la transferencia adoptiva con células T OT-

I, similar a los estudios descritos en detalle en el Ejemplo 3. Para demostrar la tolerancia inmunitaria en modelos de ratones de autoinmunidad o desinmunización de las moléculas terapéuticas, se pueden realizar constructos de PEG de 8 brazos análogos a los antígenos relevantes como se describió en la presente descripción con SIINFEKL (SEQ ID NO: 3).

#### 5 Ejemplo 8: Inducción de tolerancia inmunológica específica al antígeno a través de la unión no covalente a los eritrocitos con el antígeno conjugado con aptámero

Los métodos pueden realizarse mediante el uso de otros reactivos de bioafinidad que no sean anticuerpos para medir su capacidad de inducir tolerancia inmunológica a través de la unión no covalente a los eritrocitos. Otros grupos de afinidad basados en proteínas, tales como las proteínas diseñadas repetidas de anquirina (DARPs) (Steiner, Forrer, y otros, 10 2008), las proteínas diseñadas repetidas de armadillo (Parmeggiani, Pellarin, y otros, 2008), los dominios de fibronectina (Hackel, Kapila, y otros, 2008), y los andamios de afinidad de nudo cisteína (knottin) (Silverman, Levin, y otros, 2009) se seleccionan para aquellos que muestran afinidad de unión a los eritrocitos.

15 La selección de la biblioteca para descubrir los aptámeros de ADN/ARN de alta afinidad hacia los eritrocitos se lleva a cabo mediante el uso del método bien establecido de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) (Archemix, Cambridge, MA, Estados Unidos) (Sampson, 2003). Tras el descubrimiento de nuevas secuencias de ADN/ARN que se unen a los eritrocitos con alta afinidad, se sintetizan químicamente para incluir un grupo reactivo químico adicional en su terminal 3' o 5' para la conjugación con un antígeno y/o una nanopartícula/micela polimérica. El aptámero sintetizado químicamente, por ejemplo, alberga un grupo NH<sub>2</sub> reactivo, que se conjuga a través de la química de conjugación EDC/NHS con los grupos COOH presentes en el complejo de nanopartícula o antígeno o nanopartícula-antígeno, para generar un único bioconjugado que comprende el aptámero de unión a los eritrocitos y el antígeno o antígeno-nanopartícula. Se intentan varias técnicas de conjugación química alterando los grupos reactivos ortogonales y los esquemas de conjugación tanto en el aptámero, antígeno y/o antígeno-nanopartícula.

25 Para demostrar la inducción de tolerancia hacia OVA, el conjugado de OVA-aptámero u OVA-nanopartícula-aptámero se administra por vía intravenosa o extravascular a los ratones. En un número predeterminado de días después de la administración, se sacrifican los ratones y se recogen los ganglios linfáticos, el bazo y la sangre para su análisis. Los esplenocitos y las células derivadas de los ganglios linfáticos se colocan en placas y se reestiman durante 3 días *ex vivo* con OVA y/o péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 3), y su regulación negativa de la expresión de IFN $\gamma$ , IL-17a, IL-2 e IL-4, y la regulación positiva de TGF- $\beta$ 1, que son evidencia establecida de tolerancia, se mide por ELISA. La tinción intracelular de IFN $\gamma$ , IL-17a, IL-2 e IL-4 se realiza mediante el uso de la citometría de flujo en los esplenocitos y las células derivadas de los ganglios linfáticos después de 6 h de la reestimulación *ex vivo* con OVA y/o péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 3). Además, la citometría de flujo se usa para caracterizar los perfiles de expresión de CD4, CD8 y las células T reguladoras de los ganglios linfáticos, el bazo y las células derivadas de la sangre. Además, se toman muestras de sangre de ratones en diferentes momentos para medir las respuestas de anticuerpos humorales hacia el antígeno OVA. Un experimento variante de la reestimulación *ex vivo* se realiza para determinar si se ha establecido la tolerancia sistémica. Los ratones se administran con conjugado de OVA-anticuerpo u OVA-anticuerpo-nanopartícula como se describió anteriormente, OVA se vuelve a administrar 9 días después con un adyuvante (lipopolisacárido, adyuvante completo de Freud, alumbre u otro), y la capacidad de respuesta de los esplenocitos al antígeno OVA se evalúa por ELISA y/o citometría de flujo como se describió anteriormente. Se espera que las formulaciones de OVA-anticuerpo y/u OVA-anticuerpo-nanopartícula hagan que los esplenocitos no respondan a la segunda estimulación con la OVA y el adyuvante, lo que ilustra el establecimiento efectivo de la tolerancia sistémica. Después de la administración inicial con las formulaciones de OVA-aptámero y/u OVA-aptámero-nanopartícula, se realizarán experimentos de estimulación *in vivo* similares con líneas celulares transgénicas para demostrar la tolerancia, tal como la transferencia adoptiva con células T OT-I, similar a los estudios descritos en detalle en el Ejemplo 3. Para demostrar la tolerancia inmunitaria en modelos de ratón de autoinmunidad o desinmunización de las moléculas terapéuticas, se realizan constructos de aptámeros análogos a los antígenos relevantes como se describió en la presente descripción con la OVA.

#### 50 Ejemplo 9: Caracterización de la unión a los eritrocitos humanos

Para caracterizar los péptidos seleccionados presentados en bacterias que se unen a los eritrocitos humanos en un contexto no presentado en células, los péptidos se sintetizaron químicamente y se conjugaron con la proteína fluorescente alofococianina (APC). De esta manera, la capacidad de unión a los eritrocitos de cada péptido se caracterizó en un contexto soluble, es decir, como un conjugado de proteínas. Como se demuestra en la Figura 6, los péptidos ERY64, ERY123 y ERY141 se unen a los eritrocitos humanos como conjugados de APC

##### Método de conjugación de APC-péptido

60 Los péptidos se ordenaron y se sintetizaron por encargo a través de la síntesis estándar de péptidos fmoc en fase sólida de PolyPeptide Group (Estrasburgo, Francia). Se añadieron 10 equivalentes de péptido disuelto en 3 M guanidina-HCl a 2 mg/ml de APC activada con maleimida (InnovaBiosciences, Cambridge, Reino Unido) en PBS. Después de una incubación de 4 h a 4 °C, la reacción se desaló en una columna de desalación ZEBRA de 2 ml (Thermo Scientific) y se almacenó a 4 °C.

65 Cuantificación de la unión a los eritrocitos por el método de la citometría de flujo

La sangre humana recién aislada se disolvió 100 veces en PBS suplementado con 20 mg/ml de BSA. Se añadieron  $5 \times 10^5$  eritrocitos a 150  $\mu$ l de conjugado de APC-péptido 1  $\mu$ M y se incubaron a 37 °C durante 45 minutos. Las células se lavaron exhaustivamente en PBS + 20 mg/ml de BSA y se analizaron para determinar la fluorescencia de APC en un citómetro de flujo CyAn ADP (Beckman Coulter).

Ejemplo 10: Inducción de la tolerancia inmunológica específica al antígeno a través de la unión a los eritrocitos con el antígeno fusionado con el anticuerpo de cadena sencilla

Se generó una fusión recombinante de un scFv con el dominio inmunodominante MHC-I de OVA, SIINFEKL. El scFv resultante (en la presente descripción denominado TER119-SIINFEKL) se unió a los eritrocitos de ratón, como se demuestra por la citometría de flujo en la Figura 7.

Dado que ERY1-OVA ya se ha demostrado en la presente descripción que induce esta tolerancia, es un sistema útil para caracterizar eventos inmunológicos. Se determinó que la unión de ERY1-OVA a los eritrocitos condujo a una presentación cruzada eficaz del epítipo inmunodominante MHC I de OVA (SIINFEKL) por las células presentadoras de antígeno (APC) y el cebado cruzado correspondiente de células T reactivas. Las células T CD8<sup>+</sup> OT-I (CD45.2<sup>+</sup>) marcadas con CFSE se transfirieron adoptivamente a ratones CD45.1<sup>+</sup>, y luego se midió la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> OT-I durante 5 días después de la administración intravenosa de 10  $\mu$ g de OVA, 10  $\mu$ g de ERY1-OVA, una dosis equimolar de TER119-SIINFEKL o una dosis equimolar de SIINFEKL. La proliferación de células T CD8<sup>+</sup> OT-I, determinada por dilución de CFSE fluorescente, medido por citometría de flujo, aumentó notablemente en ratones a los que se administró TER119-SIINFEKL en comparación con ERY1-OVA u OVA (Figura 8), lo que demuestra que la unión a los eritrocitos aumentó el cebado cruzado de las células T CD8<sup>+</sup> específicas al antígeno en comparación con el antígeno soluble SIINFEKL.

Para distinguir las células T que se expanden en un fenotipo efector funcional de las que se expanden y eliminan, se analizaron las células T CD8<sup>+</sup> OT-I proliferantes para anexina-V, como un sello distintivo de la apoptosis y, por lo tanto, la eliminación, así como también el agotamiento por el marcador de muerte programada-1 (PD-1). TER119-SIINFEKL y ERY1-OVA indujeron números mucho más altos de células T CD8<sup>+</sup> OT-I proliferantes anexina-V<sup>+</sup> y PD-1<sup>+</sup> que OVA (Figura 9).

Mediante el uso de un modelo de tolerancia a la estimulación OT-I establecido (Liu, Iyoda, y otros, 2002), se demostró la capacidad de TER119-SIINFEKL y ERY1-OVA para prevenir respuestas inmunitarias posteriores a la estimulación con el antígeno mediado por vacuna, incluso con una estimulación que implica un adyuvante derivado de bacterias muy fuerte. Para inducir tolerancia, se administraron por vía intravenosa 10  $\mu$ g de OVA o ERY1-OVA, o una dosis equimolar de TER119-SIINFEKL a los 1 y 6 días después de la transferencia adoptiva de células T CD8<sup>+</sup> OT-I (CD45.2<sup>+</sup>) a ratones CD45.1<sup>+</sup>. Después de 9 días adicionales para permitir la eliminación potencial de las células T transferidas, los ratones receptores se estimularon con OVA y adyuvante con lipopolisacárido (LPS) mediante inyección intradérmica. La caracterización de las células de los ganglios linfáticos de drenaje y del bazo, así como sus respuestas inflamatorias 4 días después de la estimulación, permitieron determinar si la eliminación tuvo lugar o no.

La administración intravenosa de TER119-SIINFEKL o ERY1-OVA resultó en las reducciones profundas en las poblaciones de células T CD8<sup>+</sup> OT-I en los ganglios linfáticos de drenaje y el bazo en comparación con los ratones administrados con OVA sin modificar antes de la estimulación con el antígeno con LPS, lo que demuestra la tolerancia a la eliminación. Los ganglios linfáticos de drenaje de los ratones tratados con ERY1-OVA contenían 11 veces menos células T CD8<sup>+</sup> OT-I en comparación con los ratones tratados con OVA, y 39 veces menos que los ratones de control de la estimulación que no recibieron las inyecciones intravenosas del antígeno; las respuestas en las células del bazo fueron similares. Los ganglios linfáticos de drenaje de los ratones tratados con TER119-SIINFEKL contenían 13 veces menos células T CD8<sup>+</sup> OT-I en comparación con los ratones tratados con OVA, y más de 42 veces menos que los ratones de control de la estimulación que no recibieron las inyecciones intravenosas del antígeno; las respuestas en las células del bazo fueron similares. Esta eficaz eliminación clonal exhibida en los ratones administrados con TER119-SIINFEKL o ERY1-OVA apoyó las observaciones anteriores del cebado cruzado de células T CD8<sup>+</sup> OT-I (Figura 8) y además mostró que el cebado cruzado se produjo en ausencia de la presentación de APC de las moléculas coestimuladoras para conducir a la tolerancia a la eliminación.

Para evaluar aún más la respuesta inmunitaria después de la estimulación con el antígeno, la naturaleza inflamatoria de las células residentes de los ganglios linfáticos y el bazo se caracterizó por la expresión del interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) por las células T CD8<sup>+</sup> OT-I (Figura 10). Después de la estimulación con OVA y LPS, los ganglios linfáticos de los ratones previamente tratados con ERY1-OVA albergaban 10 veces menos células que expresan IFN $\gamma$  en comparación con los ratones de control de la estimulación (que previamente no recibieron antígeno), y más de 4 veces menos células que expresan IFN $\gamma$  en comparación con los ratones previamente tratados con una dosis equivalente de OVA. Después de la estimulación con OVA y LPS, los ganglios linfáticos de los ratones previamente tratados con TER119-SIINFEKL albergaron 33 veces menos células que expresan IFN $\gamma$  en comparación con los ratones de control de la estimulación (que previamente no recibieron antígeno), y más de 14 veces menos células que expresan IFN $\gamma$  en comparación con los ratones previamente tratados con una dosis equivalente de OVA, lo que demuestra la importancia de la unión a los eritrocitos en la protección tolerogénica a la estimulación; las respuestas en las células del bazo fueron similares.

Métodos animales

Las autoridades veterinarias suizas aprobaron previamente todos los procedimientos con animales. Se criaron ratones C57BL/6-Tg (Tcr $\alpha$ Tcr $\beta$ ) 1100Mjb (OT-I) (Jackson Labs) en el EPFL Animal Facility, y se usaron hembras para el aislamiento de los esplenocitos a las 6-12 semanas de edad. Se usaron ratones hembra B6.SJL-*Ptprc<sup>a</sup>Pepc<sup>b</sup>*/Boy (CD45.1) de 8-12 semanas de edad (Charles River) como hospederos receptores para la transferencia adoptiva de células T CD8<sup>+</sup> OT-I y los estudios de inducción de tolerancia.

Diseño de péptidos y métodos de síntesis.

El péptido ERY1 (H<sub>2</sub>N-WMVLPWLPGTLDGGSGCRG-CONH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 128) se sintetizó mediante el uso de la química estándar f-moc en fase sólida mediante el uso de la resina TGR (Nova Biochem) en un manipulador automático de líquidos (Chemspeed). La secuencia subrayada es la secuencia ERY1 12-mer que descubrimos previamente mediante la presentación en fagos como un elemento que se une a la glicoforina-A de ratón (Kontos y Hubbell, 2010). La región GGSG sirvió como un conector para el residuo de cisteína usado para la conjugación; el residuo de arginina flanqueante sirvió para disminuir el pKa y así aumentar la reactividad del residuo de cisteína (Lutolf, Tirelli, y otros, 2001). El péptido se escindió de la resina durante 3 h en 95 % de ácido trifluoroacético, 2,5 % de etanodiol, 2,5 % de agua y se precipitó en éter dietílico helado. La purificación se realizó en una HPLC-MS preparativa (Waters) mediante el uso de una columna de fase inversa C18 (Perspective Biosystems).

Métodos de conjugación de ERY1-antígeno

Se hicieron reaccionar 10 equivalentes molares de succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC, CAS# 64987-85-5, Thermo Scientific) disueltos en dimetilformamida con 5 mg/ml de OVA libre de endotoxinas (<1 UE/mg) (Hyglos GmbH) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de desalar en una columna de centrifugación ZEBA Desalt de 2 ml (Thermo Scientific), se añadieron 10 equivalentes de péptido ERY1 disuelto en guanidina-HCl 3 M y se dejó reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. El conjugado se desaló mediante el uso de columnas de centrifugación Zeba Desalt de 2 ml, se filtraron estériles 0,2  $\mu$ m, se dispensaron en alícuotas de trabajo y se almacenaron a -20 °C. La concentración de proteínas se determinó mediante BCA Assay (Thermo Scientific). El esquema da como resultado la conjugación de la cadena lateral de cisteína en el péptido con las cadenas laterales de lisina en el antígeno.

Métodos de transferencia adoptiva de células T

Las células T CD8<sup>+</sup> de bazo de ratón OT-I (CD45.2<sup>+</sup>) se aislaron mediante el uso de un kit de selección negativa de perlas magnéticas CD8 (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante. Las células CD8<sup>+</sup> OT-I recién aisladas se resuspendieron en PBS y se marcaron con éster succinimidil carboxifluoresceína 1  $\mu$ M (CFSE, Invitrogen) durante 6 minutos a temperatura ambiente, y la reacción se inactivó durante 1 minuto con un volumen igual de IMDM con FBS al 10 % (Gibco). Las células se lavaron, se contaron y se resuspendieron en IMDM puro antes de la inyección. Se inyectaron 3x10<sup>6</sup> células CD8<sup>+</sup> OT-I marcadas con CFSE por vía intravenosa en la vena de la cola de los ratones receptores CD45.1<sup>+</sup>. Para los estudios de proliferación a corto plazo, se inyectaron 10  $\mu$ g de ERY1-OVA u OVA, o una dosis equimolar de TER119-SIINFEKL en un volumen de 100  $\mu$ l 24 h después de la transferencia adoptiva. Los esplenocitos se cultivaron 5 días después de la administración del antígeno y se tiñeron para el análisis por citometría de flujo.

Métodos del modelo de estimulación y tolerancia OT-I

Se inyectaron 3x10<sup>5</sup> células T CD8<sup>+</sup> OT-I marcadas con CFSE en ratones receptores CD45.1<sup>+</sup> como se describe anteriormente. A los ratones se les administraron por vía intravenosa 10  $\mu$ g de ERY1-OVA u OVA, o una dosis equimolar de TER119-SIINFEKL en 100  $\mu$ l de solución salina en la vena de la cola, 1 y 6 días después de la transferencia adoptiva. Los ratones se estimularon con 5  $\mu$ g de OVA y 25 ng de LPS de *Escherichia coli* ultrapuro (InvivoGen) en 25  $\mu$ l por vía intradérmica en cada almohadilla de la pata trasera (método Hock, dosis total de 10  $\mu$ g de OVA y 50 ng de LPS), 15 días después de la transferencia adoptiva. Los ratones se sacrificaron 4 días después de la estimulación, y se aislaron las células de los ganglios linfáticos de drenaje y del bazo para la reestimulación. Para el análisis por citometría de flujo de las citocinas intracelulares, las células se reestimularon en presencia de 1 mg/ml de OVA o 1  $\mu$ g/ml de péptido SIINFEKL (Genscript) durante 3 h. Se añadió Brefeldin-A (Sigma, 5  $\mu$ g/ml) y se reanudó la reestimulación durante 3 h adicionales antes de la tinción y el análisis por citometría de flujo.

Anticuerpos y métodos de citometría de flujo

Los siguientes anticuerpos anti-ratón se usaron para la citometría de flujo: CD1d Pacific Blue, CD3 $\epsilon$  PerCP-Cy5.5, CD8 $\alpha$  PE-Cy7, CD45.2 Pacific Blue, IFN $\gamma$ -APC, CD8 $\alpha$  APC-eF780, (todos de eBioscience), además de la tinción fijable vivo/muerto (Invitrogen), el kit de marcaje de anexina-V-Cy5 (BioVision). Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo CyAn ADP (Beckman Coulter). Las células se lavaron primero con PBS, se tiñeron durante 20 minutos en hielo con tinción vivo/muerto, se bloquearon durante 20 minutos en hielo con medio de hibridoma 24G2, se tiñeron las superficies durante 20 minutos en hielo, se fijaron en paraformaldehído al 2 % durante 20 minutos en hielo, se tiñeron intracelularmente en presencia de saponina al 0,5 % durante 45 minutos en hielo, seguido de un lavado final antes del análisis. Para la tinción de apoptosis, se añadió anexina-V-Cy5 por 5 minutos antes del análisis.

Ejemplo 11: Generación de tolerancia inmunológica específica al antígeno hacia las proteínas terapéuticas a través de la molécula de fusión del antígeno conjugado y el péptido de unión a los eritrocitos.

Se generó una variante de asparaginasa de unión a los eritrocitos de ratón (ERY1-ASNasa) por conjugación del péptido específico a los eritrocitos de ratón ERY1 (Kontos y Hubbell, 2010). Para determinar la inmunogenicidad de la asparaginasa unida a los eritrocitos versus la asparaginasa de tipo salvaje, se realizó un estudio para evaluar dos regímenes, concretamente, la exposición a un régimen de 2 dosis y un régimen de 6 dosis del conjugado de ERY (ERY1-ASNase) o la forma nativa (ASPARAGINASE MEDAC, Medac GmbH; que también se usó como materia prima para el conjugado de ERY1-ASNase). En cada régimen, se administraron 15 µg de ERY1-ASNasa o ASNasa por vía intravenosa cada 2 días, y se extrajo sangre cada 7 días.

Después de las exposiciones a las dosis terapéuticas, los títulos de los anticuerpos se midieron en varios momentos, hasta 21 días después de la inyección final. El resultado es claro al mostrar una gran reducción en la inmunogenicidad a través de la conjugación a los eritrocitos, sin que se observen anticuerpos en lo absoluto en el régimen de 2 dosis y en la serie de régimen de 6 dosis (Fig. 11). Por el contrario, el tipo salvaje, asparaginasa nativa (como se usa clínicamente en la actualidad, en el producto ASPARAGINASE MEDAC), indujo inmunidad vigorosa incluso después del régimen de 2 dosis.

Se realizó un estudio de profilaxis para determinar si la asparaginasa de unión a los eritrocitos inducía *de buena fe* tolerancia inmunitaria a la asparaginasa de tipo salvaje. Los ratones previamente administrados con asparaginasa clínica de tipo salvaje se estimularon con una dosis adicional después del inicio de la inmunidad humoral. Los niveles de los anticuerpos aumentaron o permanecieron altos después de la nueva administración de la proteína; esto es representativo de una situación clínica peligrosa de hipersensibilidad y reacciones de choque hacia el terapéutico. Los ratones tratados previamente con asparaginasa conjugada con ERY1 no lograron inducir respuestas de anticuerpos potentes incluso después de seis estimulaciones con asparaginasa de tipo salvaje. En promedio, los ratones inducidos a tolerancia con asparaginasa de unión a los eritrocitos desarrollaron aproximadamente 6000 veces menos anticuerpos contra la asparaginasa clínica de tipo salvaje.

#### Método de conjugación de ERY1-ASNasa

Se hicieron reaccionar 10 equivalentes molares de succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC, CAS# 64987-85-5, Thermo Scientific) disueltos en dimetilformamida con 5 mg/ml de asparaginasa Medac en PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la desalación en una columna de centrifugación ZEBRA Desalt de 2 ml (Thermo Scientific), se añadieron 2,5 equivalentes del péptido ERY1 disuelto en guanidina-HCl 3 M y se dejó reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. El conjugado se desaló mediante el uso de columnas de centrifugación Zebra Desalt de 2 ml, se filtraron estériles 0,2 µm, se dispensaron en alícuotas de trabajo y se almacenaron a -20 °C. La concentración de proteínas se determinó mediante BCA Assay (Thermo Scientific). El esquema da como resultado la conjugación de la cadena lateral de cisteína en el péptido con las cadenas laterales de lisina en la proteína.

#### Detección por citometría de flujo del método de unión

La sangre humana recién aislada se diluyó 100 veces en PBS suplementado con 20 mg/ml de BSA. Se añadieron aproximadamente 500 000 eritrocitos a 100 nM de asparaginasa y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Después del lavado, las células se incubaron con anti-asparaginasa obtenido en cabra (Abnova) durante 30 minutos en hielo. Después de una segunda ronda de lavado, las células se incubaron con anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado con ALEXAFLUOR488 (Invitrogen) durante 20 minutos en hielo. Después de un lavado final, las células se analizaron en un citómetro de flujo para detectar la asparaginasa unida a los eritrocitos.

#### Método de administración de la asparaginasa

Las dosis deseadas de ERY1-ASNasa o ASNasa se prepararon en solución salina estéril al 0,9 %, y se inyectaron 100 µl de la solución en la vena de la cola de los ratones C57BL/6 anestesiados. La sangre se extrajo en momentos predeterminados, ya sea por punción en la mejilla o incisiones en la cola. *Detección de los anticuerpos anti-asparaginasa por el método del suero* El suero de los grupos experimentales se diluyó en serie en PBS y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en placas ELISA recubiertas con ASNasa. Se usó anti-IgG de ratón conjugada con HRP (Southern Biotech) como anticuerpo de detección.

#### Ejemplo 12: Reversión inmunitaria para generar tolerancia después de la inmunorreacción

En el caso clínico donde la inmunidad (ejemplificada por la presencia de anticuerpos anti-fármaco) hacia una proteína terapéutica o proteína de interés ya se ha inducido en el paciente, es deseable revertir la respuesta inmunitaria hacia el fármaco, permitiendo así un uso posterior del terapéutico. Nuevamente, la asparaginasa microbiana clínicamente disponible se usó en este ejemplo para demostrar la inducción de tolerancia hacia una proteína terapéutica en ratones con inmunidad preexistente contra asparaginasa. Se generó una variante de asparaginasa de unión a los eritrocitos de ratón (ERY1-ASNasa) mediante conjugación del péptido específico a los eritrocitos de ratón ERY1.

Se realizó un estudio cruzado para determinar si la asparaginasa de unión a los eritrocitos podría revertir la inmunidad hacia la asparaginasa clínica. A los ratones se les administraron múltiples dosis intravenosas de asparaginasa de tipo salvaje con dos días de diferencia. Se detectaron altos niveles de anticuerpos anti-asparaginasa en suero 21 días después de la administración. Los ratones inmunizados se trataron terapéuticamente con regímenes de asparaginasa de unión a los eritrocitos a dosis variables. En ambos regímenes de dosificación, la asparaginasa conjugada con ERY redujo los niveles de anticuerpos aproximadamente 10 veces, invirtiendo así la inmunidad humoral preexistente.

#### Método de conjugación de ERY1-ASNasa

Se hicieron reaccionar 10 equivalentes molares de succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC, CAS# 64987-85-5, Thermo Scientific) disueltos en dimetilformamida con 5 mg/ml de ASPARAGINASE MEDAC en PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la desalación en una columna de centrifugación ZEBRA Desalt de 2 ml (Thermo Scientific), se añadieron 2,5 equivalentes del péptido ERY1 disuelto en guanidina-HCl 3 M y se dejó reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. El conjugado se desaló mediante el uso de columnas de centrifugación ZEBRA Desalt de 2 ml, se filtraron estériles 0,2 µm, se dispensaron en alícuotas de trabajo y se almacenaron a -20 °C. La concentración de proteínas se determinó mediante BCA Assay (Thermo Scientific). El esquema da como resultado la conjugación de la cadena lateral de cisteína en el péptido con las cadenas laterales de lisina en la proteína.

#### Detección por citometría de flujo del método de unión

La sangre humana recién aislada se diluyó 100 veces en PBS suplementado con 20 mg/ml de BSA. Se añadieron aproximadamente 500 000 eritrocitos a 100 nM de asparaginasa y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Después del lavado, las células se incubaron con anti-asparaginasa obtenido en cabra (Abnova) durante 30 minutos en hielo. Después de una segunda ronda de lavado, las células se incubaron con anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado con ALEXAFLUOR488 (Invitrogen) durante 20 minutos en hielo. Después de un lavado final, las células se analizaron en un citómetro de flujo para detectar la asparaginasa unida a los eritrocitos.

#### Método de administración de la asparaginasa

Las dosis deseadas de ERY1-ASNasa o ASNasa se prepararon en solución salina estéril al 0,9 %, y se inyectaron 100 µl de la solución en la vena de la cola de los ratones C57BL/6 anestesiados. La sangre se extrajo en momentos predeterminados, ya sea por punción en la mejilla o incisiones en la cola.

#### Detección de anticuerpos anti-asparaginasa por el método del suero

El suero de los grupos experimentales se diluyó en serie en PBS y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en placas ELISA recubiertas con ASNasa. Se usó anti-IgG de ratón conjugada con HRP (Southern Biotech) como anticuerpo de detección.

#### Ejemplo 13: Desarrollo de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen a los eritrocitos de ratón y/o humanos

Se han generado varios constructos de antígeno de unión a los eritrocitos. Estos incluyen los relacionados con el nivel de proteína: TER119-SIINFEKL, TER119-ChrA, y TER119-proinsulina. Estos también incluyen los relacionados con el nivel genético: TER119-SIINFEKL, TER119-ChrA TER119-proinsulina, TER119-uricasa, TER119-InsB9-23, TER119-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 80), TER119-H-2kb, TER119-H-2kd, 10F7-SIINFEKL, 10F7-ChrA, 10F7-proinsulina, y 10F7-micasa.

#### Métodos

El ARNm del clon del hibridoma TER-119 se obtuvo como regalo del profesor Shozo Izui en la Universidad de Ginebra, Suiza. La PCR de transcriptasa inversa estándar (RT-PCR) se realizó mediante el uso de SUPERScript III FIRST STRAND SYNTHESIS SYSTEM (Invitrogen) para generar ADN complementario (ADNc) del clon. Luego se realizó la PCR mediante el uso del siguiente conjunto de cebadores para amplificar específicamente las secuencias de ADN de las regiones variable pesada (VH) y variable ligera (VL) del anticuerpo:

# ES 2 781 773 T3

| Nombre del Cebador | Secuencia del cebador (5' a 3')                      | SEQ ID NO     |
|--------------------|------------------------------------------------------|---------------|
| VL-FOR1            | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TCC AGC TGA<br>CTC AGT C     | SEQ ID NO:81  |
| VL-FOR2            | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TTC TCW<br>CCC AGT C     | SEQ ID NO:82  |
| VL-FOR3            | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGM TMA<br>CTC AGT C     | SEQ ID NO:83  |
| VL-FOR4            | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGY TRA<br>CAC AGT C     | SEQ ID NO:84  |
| VL-FOR5            | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TRA TGA<br>CMC AGT C     | SEQ ID NO:85  |
| VL-FOR6            | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTM AGA TRA<br>MCC AGT C     | SEQ ID NO:86  |
| VL-FOR7            | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTC AGA TGA<br>YDC AGT C     | SEQ ID NO:87  |
| VL-FOR8            | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TYC AGA TGA<br>CAC AGA C     | SEQ ID NO:88  |
| VL-FOR9            | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TTC TCA<br>WCC AGT C     | SEQ ID NO:89  |
| VL-FOR10           | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG WGC TSA<br>CCC AAT C     | SEQ ID NO:90  |
| VL-FOR11           | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTS TRA TGA<br>CCC ART C     | SEQ ID NO:91  |
| VL-FOR12           | AGC CGG CCA TGG CGG AYR TTK TGA TGA<br>CCC ARA C     | SEQ ID NO:92  |
| VL-FOR13           | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA<br>CBC AGK C     | SEQ ID NO:93  |
| VL-FOR14           | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TAA<br>CYC AGG A     | SEQ ID NO:94  |
| VL-FOR15           | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA<br>CCC AGW T     | SEQ ID NO:95  |
| VL-FOR16           | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA<br>CAC AAC C     | SEQ ID NO:96  |
| VL-FOR17           | AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTT TGC TGA<br>CTC AGT C     | SEQ ID NO:97  |
| VL-FOR1 8          | AGC CGG CCA TGG CGG ARG CTG TTG TGA<br>CTC AGG AAT C | SEQ ID NO:98  |
| VL-REV1            | GAT GGT GCG GCC GCA GTA CGT TTG ATT<br>TCC AGC TTG G | SEQ ID NO:99  |
| VL-REV2            | GAT GGT GCG GCC GCA GTA CGT TTT ATT<br>TCC AGC TTG G | SEQ ID NO:100 |
| VL-REV3            | GAT GGT GCG GCC GCA GTA CGT TTT ATT<br>TCC AAC TTT G | SEQ ID NO:101 |
| VL-REV4            | GAT GGT GCG GCC GCA GTA CGT TTC AGC<br>TCC AGC TTG G | SEQ ID NO:102 |

# ES 2 781 773 T3

| Nombre del Cebador | Secuencia del cebador (5' a 3')                                           | SEQ ID NO     |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------|
| VL-REV5            | GAT GGT GCG GCC GCA GTA CCT AGG ACA<br>GTC AGT TTG G                      | SEQ ID NO:103 |
| VL-REV6            | GAT GGT GCG GCC GCA GTA CCT AGG ACA<br>GTG ACC TTG G                      | SEQ ID NO:104 |
| VH-FOR1            | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GGA KGT RMA GCT TCA GGA GTC    | SEQ ID NO:105 |
| VH-FOR2            | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GGA GGT BCA GCT BCA GCA GTC    | SEQ ID NO:106 |
| VH-FOR3            | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GCA GGT GCA GCT GAA GSA STC    | SEQ ID NO:107 |
| VH-FOR4            | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GGA GGT CCA RCT GCA ACA RTC    | SEQ ID NO:108 |
| VH-FOR5            | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GCA GGT YCA GCT BCA GCA RTC    | SEQ ID NO:109 |
| VH-FOR6            | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GCA GGT YCA RCT GCA GCA GTC    | SEQ ID NO:110 |
| VH-FOR7            | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GCA GGT CCA CGT GAA GCA GTC    | SEQ ID NO:111 |
| VH-FOR8            | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GGA GGT GAA SST GGT GGA ATC    | SEQ ID NO:112 |
| VH-FOR9            | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GGA VGT GAW GYT GGT GGA GTC    | SEQ ID NO:113 |
| VH-FOR10           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GGA GGT GCA GSK GGT GGA GTC    | SEQ ID NO:114 |
| VH-FOR11           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GGA KGT GCA MCT GGT GGA GTC    | SEQ ID NO:115 |
| VH-FOR12           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GGA GGT GAA GCT GAT GGA RTC    | SEQ ID NO:116 |
| VH-FOR13           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GGA GGT GCA RCT TGT TGA GTC    | SEQ ID NO:117 |
| VH-FOR14           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GGA RGT RAA GCT TCT CGA GTC    | SEQ ID NO:118 |
| VH-FOR15           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GGA AGT GAA RST TGA GGA GTC    | SEQ ID NO:119 |
| VH-FOR16           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GCA GGT TAC TCT RAA AGW GTS TG | SEQ ID NO:120 |
| VH-FOR17           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GCA GGT CCA ACT VCA GCA RCC    | SEQ ID NO:121 |
| VH-FOR18           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GGA TGT GAA CTT GGA AGT GTC    | SEQ ID NO:122 |
| VH-FOR19           | GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT<br>GGC GGA GGT GAA GGT CAT CGA GTC    | SEQ ID NO:123 |
| VH-REV1            | CCC TTG AAG CTT GCT GAG GAA ACG GTG<br>ACC GTG GT                         | SEQ ID NO:124 |

| Nombre del Cebador | Secuencia del cebador (5' a 3')                   | SEQ ID NO     |
|--------------------|---------------------------------------------------|---------------|
| VH-REV2            | CCC TTG AAG CTT GCT GAG GAG ACT GTG<br>AGA GTG GT | SEQ ID NO:125 |
| VH-REV3            | CCC TTG AAG CTT GCT GCA GAG ACA GTG<br>ACC AGA GT | SEQ ID NO:126 |
| VH-REV4            | CCC TTG AAG CTT GCT GAG GAG ACG GTG<br>ACT GAG GT | SEQ ID NO:127 |

Los genes amplificados de VH y VL se digirieron luego con endonucleasas de restricción (NcoI y NotI para VL, NdeI y HindIII para VH), los fragmentos de los genes se purificaron después de la electroforesis en agarosa mediante el uso de un kit estándar (Zymo Research, Orange, CA, Estados Unidos), y se ligaron en un plásmido de clonación pMAZ360. El plásmido de clonación se secuenció para determinar la secuencia de ADN de los genes de VH y VL de TER119.

Los constructos de ADN del antígeno TER119 y 10F7 se diseñaron y sintetizaron comercialmente y se obtuvieron de DNA2.0 (Menlo Park, CA, Estados Unidos).

Cada gen de scFv completo final se digirió con SfiI y XhoI (NEB, Ipswich, MA, Estados Unidos) y se ligó a los mismos sitios en el plásmido de expresión de mamífero pSecTagA (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

**Ejemplo 14:** Inducción de tolerancia hacia los antígenos diabéticos mediante el uso de antígenos de diabetes que se unen a los eritrocitos

El péptido mimotópico de cromogranina-A (denominado 1040-p31 o ChrA) se diseñó para unirse a los eritrocitos de ratón mediante la fusión de forma recombinante del péptido con scFv TER119 específico a los eritrocitos de ratón. El scFv resultante, en la presente descripción denominado TER119-ChrA, se unió fuertemente a los eritrocitos de ratón (datos no mostrados). Para estudiar el comportamiento de las células T hacia las variantes del antígeno cromogranina-A, se usó el ratón transgénico NODBDC2.5, que alberga células T específicas para el reconocimiento del antígeno cromogranina-A. Para determinar si TER119-ChrA se procesó y se mostró en los principales complejos de histocompatibilidad-II (MHC-II) de manera suficiente para la preparación de células T BDC2.5, el antígeno se añadió a un sistema de cocultivo con células dendríticas esplénicas BDC2.5 y células T CD4. Como se demostró en la Figura 12, TER119-ChrA se procesó de manera eficiente y se mostró el dominio antigénico correcto en MHC-II para estimular la proliferación específica al antígeno de las células T CD4 BDC2.5 transgénicas *in vitro* que es un requisito para la tolerancia de células T *in vivo*.

Para determinar las consecuencias de la unión a los eritrocitos del autoantígeno en la proliferación de CD4 *in vivo*, se realizó un estudio de proliferación similar mediante el uso de células T CD4 BDC2.5 marcadas con la molécula fluorescente CFSE. Después de la transferencia adoptiva de las células T CD4 BDC2.5 marcadas a ratones NOD no tratados, se administraron por vía intravenosa 10 µg de TER119-ChrA o una dosis equimolar de péptido 1040-p31 soluble libre. Como se demuestra en la Figura 13, los ratones tratados con TER119-ChrA albergaban muchas menos células T CD4 BDC2.5 no proliferantes tanto en el bazo como en los ganglios linfáticos pancreáticos (pLN) en comparación con los ratones tratados con el péptido soluble 1040-p31. Estos datos demuestran que el antígeno de unión a los eritrocitos impulsa la potente señalización y cebado de células T CD4 específicas al antígeno de una manera funcionalmente distinta del antígeno soluble, de forma similar a las investigaciones exhaustivas de los inventores sobre la tolerancia a la eliminación de células T CD8. Tal reducción marcada en las células T diabéticas sistémicas (bazo) y locales (ganglios linfáticos pancreáticos) es una clara indicación positiva de un resultado favorable para el control del inicio de la enfermedad.

**Ejemplo 15:** Inducción de tolerancia hacia la insulina

Como ya se demostró en la presente descripción (por ejemplo, véase el Ejemplo 14), puede generarse tolerancia hacia varios antígenos. Este ejemplo describe cómo puede generarse tolerancia a la insulina. Con el fin de inducir tolerancia hacia la insulina, que es otro antígeno del islote reconocido por las células T diabéticas, la insulina se diseñó para unirse a los eritrocitos de ratón mediante la fusión recombinante al scFv TER119 específico a los eritrocitos de ratón. El scFv resultante, denominado en la presente descripción TER119-proinsulina, se implementa en el modelo de ratón convencional de T1D de inicio espontáneo, concretamente, el ratón NOD/ShiLt. El ratón NOD/ShiLt sufre espontáneamente la destrucción mediada por células inmunitarias del tejido pancreático productor de insulina, lo que induce hiperglucemia y aparición clínica de la enfermedad. De manera similar, la insulina humana y los factores de unión a los eritrocitos humanos pueden usarse para generar tolerancia a la insulina en humanos.

Para demostrar tolerancia en este robusto modelo de ratón espontáneamente autoinmunitario, se administrará TER119-proinsulina a ratones jóvenes (~3 semanas) a intervalos de tiempo y dosis variables para inactivar y/o eliminar funcionalmente las células T reactivas a la insulina. Los niveles de glucosa de los ratones tratados se controlan para evaluar la hiperglucemia y el inicio clínico de la enfermedad. TER119-proinsulina también se usa en modo terapéutico para

inducir la remisión de la enfermedad. En dicho estudio, la TER119-proinsulina se administra a ratones hiperglucémicos de inicio reciente a dosis e intervalos de tiempo variables, y se monitorean los niveles de glucosa para evaluar la reducción de la hiperglucemia y el retorno a la homeostasis, lo que demuestra la remisión del inicio clínico de la T1D.

#### 5 Ejemplo 16: Generación de tolerancia hacia los injertos celulares y los trasplantes mediante el uso de moléculas de MHC de unión a los eritrocitos

10 A modo de ejemplo, se proporciona un proceso de generación de tolerancia de injertos. Las moléculas de MHC de unión a los eritrocitos se diseñan mediante la conjugación química de péptidos de unión a los eritrocitos con dominios de MHC solubles. Alternativamente, la molécula de MHC puede expresarse de forma recombinante como una fusión con un scFv específico a los eritrocitos.

15 Con el fin de demostrar tolerancia hacia las moléculas de MHC mediante la unión a los eritrocitos, se llevan a cabo modelos de injerto celular en ratones, tales como injertos de tumor, injertos de piel, trasplantes de islotes y trasplantes de células hematopoyéticas. En cada estudio, el ratón huésped se induce a tolerancia hacia la clase de MHC donante mediante la administración de MHC de unión a los eritrocitos antes o durante el procedimiento de injerto. La aceptación del injerto se monitorea mediante el uso de métodos apropiados para cada estudio; es decir, la medición del crecimiento tumoral en los injertos tumorales, el monitoreo de la necrosis tisular o el crecimiento en trasplante de piel, el monitoreo de la masa de los islotes y la glucemia en trasplantes de islotes, y la caracterización del quimerismo en trasplantes de células hematopoyéticas.

#### 20 Descripción adicional

25 Una modalidad es una composición para producir inmunotolerancia, la composición comprende una fusión molecular que comprende un antígeno tolerogénico y un grupo de unión a los eritrocitos que se une específicamente a un eritrocito en el paciente y de ese modo une el antígeno al eritrocito, en donde la fusión molecular se administra en una cantidad efectiva para producir inmunotolerancia a una sustancia que comprende el antígeno tolerogénico. Una modalidad es la composición en donde la fusión molecular consiste en al menos un grupo de unión a los eritrocitos covalentemente unido de manera directa al antígeno: por ejemplo, una proteína de fusión que comprende el grupo y el antígeno. Una modalidad es la composición en donde la fusión molecular comprende al menos un grupo de unión a los eritrocitos unido a una partícula que se une o contiene el antígeno, por ejemplo, en donde la partícula se elige del grupo que consiste en una micropartícula, una nanopartícula, un liposoma, un polimerosoma y una micela. Una modalidad es el caso en donde el antígeno tolerogénico comprende una parte de una proteína terapéutica, por ejemplo, la proteína comprende el factor VIII o el factor IX. Una modalidad es el caso en donde el antígeno tolerogénico comprende una parte de una proteína no humana. Una modalidad es el caso en donde la proteína comprende adenosina desaminasa, L-asparaginasa, rasburicasa, globulina antitumoral, L-arginasa y L-metionasa. Una modalidad es el método en donde el paciente es un ser humano y el antígeno tolerogénico comprende una parte de una proteína que no se encuentra en la naturaleza. Una modalidad es el caso en donde el paciente es un ser humano y el antígeno tolerogénico comprende un glicano de una proteína que comprende la glicosilación no humana. Una modalidad es el caso en donde el antígeno tolerogénico comprende al menos una parte de un antígeno de trasplante humano. Una modalidad es el caso en donde el antígeno tolerogénico comprende una parte de una proteína de enfermedad autoinmunitaria humana, por ejemplo, que se elige del grupo que consiste en preproinsulina, proinsulina, insulina, GAD65, GAD67, IA-2, IA-2 $\beta$ , tiroglobulina, peroxidasa tiroidea, receptor de tirotropina, proteína básica de mielina, glicoproteína de oligodendrocitos de mielina, proteína proteolípida, colágeno II, colágeno IV, receptor de acetilcolina, metaloproteína de la matriz 1 y 3, chaperona molecular proteína de choque térmico 47, fibrilina-1, receptor  $\alpha$  de PDGF, receptor  $\beta$  de PDGF, y proteína nuclear SS-A. Una modalidad es el caso en donde el antígeno tolerogénico comprende una parte de un alimento humano, por ejemplo, se elige del grupo que consiste en conarachina (Ara h 1), alérgeno II (Ara h 2), aglutinina de arachis (Ara h 6),  $\alpha$ -lactalbúmina (ALA), lactotransferrina, gluteína, gluteína de bajo peso molecular,  $\alpha$ - y  $\gamma$ -gliadina, hordeína, secalina y avenina. Una modalidad es el caso en donde el grupo de unión a los eritrocitos se elige del grupo que consiste en un ligando peptídico que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 17. Un ejemplo es el caso en donde el grupo de unión a los eritrocitos comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un scFv derivado de un hibridoma que produce un anticuerpo contra un eritrocito, donde se elige el hibridoma del grupo que consiste en BRIC 4, BRIC 5, BRIC 6, BRIC 10, BRIC 14, BRIC 18, BRIC 39, BRIC 66, BRIC 68, BRIC 69, BRIC 87, BRIC 108, BRIC 110, BRIC 111, BRIC 125, BRIC 126, BRIC 128, BRIC 145, BRIC 155, BRIC 157, BRIC 163, BRIC 170, BRIC 198, BRIC 203, BRIC 216, BRIC 220, BRIC 221, BRIC 222, BRIC 229, BRIC 230, BRIC 231, BRIC 235, BRIC 256, BRIC 17, BRIC 18, BGRL 1, BGRL 2, BGRL 11, BGRL 100, BRAD 3, BIRMA D6, BIRMA D10, BIRMA K3, BIRMA K3, 84B; 6A7; COE; o KZ1. Una modalidad es el caso en donde el grupo de unión a los eritrocitos se une específicamente a una biomolécula que se elige del grupo que consiste en banda 3 (CD233), aquaporina-1, Glut-1, antígeno Kidd, RhAg/Rh50 (CD241), Rh (CD240), Rh30CE (CD240CE), Rh30D (CD240D), Kx, glicoforina A, glicoforina B (CD235b), glicoforina C (CD235c), glicoforina D (CD235d), Kell (CD238), Duffy/DARci (CD234), CR1 (CD35), DAF (CD55), globosida, CD44, ICAM-4 (CD242), Lu/B-CAM (CD239), XG1/XG2 (CD99), EMMPRIN/neurotelina (CD147), JMH, glicosiltransferasa, Cartwright, Dombrock, C4 A/CAB, Scianna, MER2, estomatina, BA-1 (CD24), GPIV (CD36), CD108, CD139 y antígeno H (CD 173). El antígeno tolerogénico puede comprender un mimotopo. Un ejemplo es el caso en donde el scFv comprende una parte o la totalidad de 10F7, por ejemplo, una o más de una cadena ligera de 10F7 y/o una cadena pesada de 10F7 y/o una variante de mayor afinidad de una cadena ligera de 10F7 y/o una cadena pesada de 10F7. Una modalidad es la composición en donde el grupo de unión a los eritrocitos comprende un ligando peptídico que comprende al menos 5

residuos de aminoácidos consecutivos de una secuencia que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, y las sustituciones conservadoras de estas, en donde dicha secuencia se une específicamente a un eritrocito.

5 Una modalidad es una composición que comprende una fusión molecular que comprende un antígeno tolerogénico y un grupo de unión a los eritrocitos que se une específicamente a un eritrocito en el paciente y, por lo tanto, une el antígeno al eritrocito, en donde el grupo de unión a los eritrocitos se une covalentemente al antígeno. Otro caso es el caso en donde la fusión molecular comprende el grupo de unión a los eritrocitos unido a una partícula que se une al antígeno, por ejemplo, una micropartícula, una nanopartícula, un liposoma, un polimerosoma o una micela. Ejemplos de un antígeno tolerogénico son: una parte de una proteína terapéutica, una parte de una proteína no humana, una parte (incluida la parte completa, es decir, toda) de una proteína que no se encuentra de forma natural en un ser humano, un glucano de una proteína que comprende glicosilación no humana, una parte de un antígeno autoinmunitario humano, una parte de un alimento humano. Una modalidad es la composición en donde el grupo de unión a los eritrocitos se elige del grupo que consiste en un ligando peptídico, el ligando peptídico comprende al menos 5 residuos de aminoácidos consecutivos de una secuencia que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, y las sustituciones conservadoras de estas, en donde dicha secuencia se une específicamente a un eritrocito. El grupo de unión a los eritrocitos puede ser uno que comprenda un ligando peptídico que tenga una constante de disociación de entre aproximadamente 10  $\mu$ M y 0,1 nM según lo determinado por las medidas de equilibrio de unión entre el péptido y los eritrocitos. Un ejemplo es el caso en donde el grupo de unión a los eritrocitos comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un scFv derivado de un hibridoma que produce un anticuerpo contra un eritrocito, donde se elige el hibridoma del grupo que consiste en BRIC 4, BRIC 5, BRIC 6, BRIC 10, BRIC 14, BRIC 18, BRIC 39, BRIC 66, BRIC 68, BRIC 69, BRIC 87, BRIC 108, BRIC 110, BRIC 111, BRIC 125, BRIC 126, BRIC 128, BRIC 145, BRIC 155, BRIC 157, BRIC 163, BRIC 170, BRIC 198, BRIC 203, BRIC 216, BRIC 220, BRIC 221, BRIC 222, BRIC 229, BRIC 230, BRIC 231, BRIC 235, BRIC 256, BRAC 17, BRAC 18, BGRL 1, BGRL 2, BGRL 11, BGRL 100, BRAD 3, BIRMA D6, BIRMA D10, BIRMA K3, BIRMA K3, 84B; 6A7; COE; o KZ1. Una modalidad es el caso en donde el grupo de unión a los eritrocitos se une específicamente a una biomolécula que se elige del grupo que consiste en banda 3 (CD233), aquaporina-1, Glut-1, antígeno Kidd, RhAg/Rh50 (CD241), Rh (CD240), Rh30CE (CD240CE), Rh30D (CD240D), Kx, glicoforina A, glicoforina B (CD235b), glicoforina C (CD235c), glicoforina D (CD235d), Kell (CD238), Duffy/DARCI (CD234), CR1 (CD35), DAF (CD55), globosida, CD44, ICAM-4 (CD242), Lu/B-CAM (CD239), XG1/XG2 (CD99), EMMPRIN/neurotelina (CD147), JMH, glicosiltransferasa, Cartwright, Dombrock, C4 A/CAB, Scianna, MER2, estomatina, BA-1 (CD24), GPIV (CD36), CD108, CD139 y antígeno H (CD 173). El antígeno tolerogénico puede comprender un mimotopo.

35 Las composiciones tolerogénicas pueden usarse para tratar una afección patológica, por ejemplo, una afección patológica que se elige del grupo que consiste en rechazo de trasplante, enfermedad autoinmunitaria, alergia alimentaria y respuesta inmunitaria contra un agente terapéutico.

Una modalidad es una composición farmacéuticamente aceptable para su uso en la reversión inmunitaria de una respuesta inmunitaria contra una sustancia que comprende una molécula de fusión que comprende un grupo de unión a los eritrocitos y un antígeno de la sustancia. La composición puede tener el antígeno tolerogénico que se elige, por ejemplo, del grupo que consiste en una proteína, una parte de una proteína, una proteína humana o una parte de esta, una proteína no humana o una parte de esta, un glicano, un glicano de una proteína que comprende glicosilación no humana, un antígeno autoinmunitario humano, una proteína terapéutica para un humano o una parte de esta, y una parte de un alimento humano. La composición puede tener el antígeno tolerogénico que se elige, por ejemplo, del grupo que consiste en proteínas deficientes por enfermedad genética, proteínas con glicosilación no humana, proteínas no humanas, proteínas sintéticas que no se encuentran de forma natural en humanos, antígenos alimentarios humanos, antígenos de trasplante humano y antígenos autoinmunitarios humanos. El grupo de unión a los eritrocitos puede proporcionar que se une específicamente a una biomolécula que se elige del grupo que consiste en banda 3 (CD233), aquaporina-1, Glut-1, antígeno Kidd, RhAg/Rh50 (CD241), Rh (CD240), Rh30CE (CD240CE), Rh30D (CD240D), Kx, glicoforina A, glicoforina B (CD235b), glicoforina C (CD235c), glicoforina D (CD235d), Kell (CD238), Duffy/DARCI (CD234), CR1 (CD35), DAF (CD55), globosida, CD44, ICAM-4 (CD242), Lu/B-CAM (CD239), XG1/XG2 (CD99), EMMPRIN/neurotelina (CD147), JMH, glicosiltransferasa, Cartwright, Dombrock, C4 A/CAB, Scianna, MER2, estomatina, BA-1 (CD24), GPIV (CD36), CD108, CD139 y antígeno H (CD 173). El grupo de unión a los eritrocitos puede elegirse del grupo que consiste en un ligando peptídico, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y un dominio de unión al antígeno de cadena sencilla (scFv). El grupo de unión a los eritrocitos puede prepararse de modo que comprenda un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un scFv derivado de un hibridoma que produce un anticuerpo contra un eritrocito, donde se elige el hibridoma del grupo que consiste en BRIC 4, BRIC 5, BRIC 6, BRIC 10, BRIC 14, BRIC 18, BRIC 39, BRIC 66, BRIC 68, BRIC 69, BRIC 87, BRIC 108, BRIC 110, BRIC 111, BRIC 125, BRIC 126, BRIC 128, BRIC 145, BRIC 155, BRIC 157, BRIC 163, BRIC 170, BRIC 198, BRIC 203, BRIC 216, BRIC 220, BRIC 221, BRIC 222, BRIC 229, BRIC 230, BRIC 231, BRIC 235, BRIC 256, BRAC 17, BRAC 18, BGRL 1, BGRL 2, BGRL 11, BGRL 100, BRAD 3, BIRMA D6, BIRMA D10, BIRMA K3, BIRMA K3, 84B; 6A7; COE; o KZ1.

Las modalidades incluyen una molécula de fusión que comprende un grupo de unión a los eritrocitos y un antígeno de asparaginasa. Como es evidente por las múltiples revelaciones de los grupos de unión a los eritrocitos, hay muchas opciones para lo mismo, que incluyen: un ligando peptídico de unión que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, y las sustituciones

conservadoras de estas, en donde dicha secuencia se une específicamente a un eritrocito. Dicha composición que comprende la molécula de fusión puede usarse para inducir tolerancia a la asparaginasa.

Las modalidades incluyen una molécula de fusión que comprende un grupo de unión a los eritrocitos y un antígeno de cromogranina-A. El antígeno puede ser un mimotopo o una parte o la totalidad de una cromogranina-A. Como es evidente por las múltiples revelaciones de los grupos de unión a los eritrocitos, hay muchas opciones para lo mismo, que incluyen: un ligando peptídico de unión que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, y las sustituciones conservadoras de estas, en donde dicha secuencia se une específicamente a un eritrocito. Dicha composición que comprende la molécula de fusión puede usarse para inducir tolerancia a la cromogranina A y/o para prevenir la diabetes o reducir la progresión de una enfermedad de la diabetes.

Otra instancia es una composición que comprende un grupo de unión a los eritrocitos que se une específicamente a un eritrocito unido a una entidad que se elige del grupo que consiste en un polímero sintético, un polímero sintético ramificado y una partícula. La partícula puede ser, por ejemplo, una micropartícula, una nanopartícula, un liposoma, un polimerosoma y una micela. La composición puede comprender además un antígeno tolerogénico, un agente terapéutico o un ligando de migración al tumor.

Un ejemplo es un dominio de unión al antígeno de cadena sencilla (scFv) que comprende un ligando peptídico que se une específicamente a un eritrocito. El péptido puede unirse al scFv o disponerse en una parte del conector. Pueden incluirse uno o más de los ligandos peptídicos.

Todas las solicitudes de patentes, las patentes y las publicaciones mencionadas en la presente descripción se incorporan por la presente descripción como referencia para todos los fines en la presente descripción; en caso de conflicto, la especificación instantánea controla.

#### Referencias

1. Pasut G y Veronese FM (2009) "PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: an overview." *Adv Drug Deliv Rev* 61 (13):1177-1188.
2. Fishburn CS (2008) "The pharmacology of PEGylation: balancing PD with PK to generate novel therapeutics." *J Pharm Sci* 97(10):4167-4183.
3. Gao W, Liu W, Mackay JA, Zalutsky MR, Toone EJ, y Chilkoti A (2009) "In situ growth of a stoichiometric PEG-like conjugate at a protein's N-terminus with significantly improved pharmacokinetics." *Proc Natl Acad Sci USA* 106(36):15231-15236.
4. Huang L, Gough PC, y Defelippis MR (2009) "Characterization of poly(ethylene glycol) and PEGylated products by LC/MS with postcolumn addition of amines." *Anal Chem* 81(2):567-577.
5. Bailon P, Palleroni A, Schaffer CA, Spence CL, Fung WJ, Porter JE, Ehrlich GK, Pan W, Xu ZX, Modi MW, Farid A, Berthold W, y Graves M (2001) "Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C." *Bioconjug Chem* 12(2): 195-202.
6. Dhalluin C, Ross A, Leuthold LA, Foser S, Gsell B, Miiller F, y Senn H (2005) "Structural and biophysical characterization of the 40 kDa PEG-interferon-alpha2a and its individual positional isomers." *Bioconjug Chem* 16(3):504-517.
7. Dennis M (2002) "Albumin Binding as a General Strategy for Improving the Pharmacokinetics of Proteins." *Journal of Biological Chemistry* 277(38):35035-35043.
8. Walker A, Dunlevy G, Rycroft D, Topley P, Holt LJ, Herbert T, Davies M, Cook F, Holmes S, Jespers L, y Herring C (2010) "Anti-serum albumin domain antibodies in the development of highly potent, efficacious and long-acting interferon." *Protein Engineering Design and Selection*.
9. Hall SS, Mitragotri S, y Daugherty PS (2007) "Identification of peptide ligands facilitating nanoparticle attachment to erythrocytes." *Biotechnol Prog* 23(3):749-754.
10. Godsel LM, Wang K, Schodin BA, Leon JS, Miller SD, y Engman DM (2001) "Prevention of autoimmune myocarditis through the induction of antigen-specific peripheral immune tolerance." *Circulation* 103(12): 1709-1714.
11. Luo X, Pothoven KL, McCarthy D, DeGutes M, Martin A, Getts DR, Xia G, He J, Zhang X, Kaufman DB, y Miller SD (2008) "ECDI-fixed allogeneic splenocytes induce donor-specific tolerance for long-term survival of islet transplants via two distinct mechanisms." *Proc Natl Acad Sci USA* 105(38): 14527-14532.
12. Fife BT, Guleria I, Gubbels Bupp M, Eagar TO, Tang Q, Bour-Jordan H, Yagita H, Azuma M, Sayegh MH, y Bluestone JA (2006) "Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1-PD-L1 pathway." *J Exp Med* 203(12):2737-2747.
13. Miller SD, Turley DM, y Podojil JR (2007) "Antigen-specific tolerance strategies for the prevention and treatment of autoimmune disease." *Nat Rev Immunol* 7(9):665-677.
14. Maluccio MA, Covey AM, Porat LB, Schubert J, Brody LA, Sofocleous CT, Getrajdman GI, Jarnagin W, Dematteo R, Blumgart LH, Fong Y, y Brown KT (2008) "Transcatheter arterial embolization with only particles for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma." *J Vase Interv Radiol* 19(6):862-869.
15. Gadaleta CD y Ranieri G (2010) "Trans-arterial chemoembolization as a therapy for liver tumours: New clinical developments and suggestions for combination with angiogenesis inhibitors." *Crit Rev Oncol Hematol*.
16. Huang X, Molema G, King S, Watkins L, Edgington TS, y Thorpe PE (1997) "Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature." *Science* 275(5299):547-550.
17. Sheridan C (2010) "Fresh from the biologic pipeline-2009." *Nat Biotechnol* 28(4):307-310.
18. Maynard J y Georgiou G (2000) "Antibody engineering." *Annual review of biomedical engineering* 2:339-376.
19. Weissner NE y Hall JC (2009) "Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics." *Biotechnol Adv* 27(4):502-520.
20. Moghimi SM y Szebeni J (2003) "Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties." *Prog Lipid Res* 42(6):463-478.
21. Vogl TJ, Nagueib NN, Nour-Eldin NE, Rao P, Emami AH, Zangos S, Nabil M, y Abdelkader A (2009) "Review on transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma: palliative, combined, neoadjuvant, bridging, and symptomatic indications." *Eur J Radiol* 72(3):505-516.
22. Fonsatti E, Nicolay HJ, Altomonte M, Covre A, y Maio M (2010) "Targeting

- cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours." *Cardiovasc Res* 86(1):12-19. 23. Dienst A, Grunow A, Unruh M, Rabausch B, Nör JE, Fries JW, y Gottstein C (2005) "Specific occlusion of murine and human tumor vasculature by VCAM-1 -targeted recombinant fusion proteins." *CancerSpectrum Knowledge Environment* 97(10):733-747. 24. Ruoslahti E, Bhatia SN, y Sailor MJ (2010) "Targeting of drugs and nanoparticles to tumors." *J Cell Biol* 188(6):759-768. 25. Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, Dings RP, Nesmelova I, Satijn S, Verhofstad N, Nakabeppu Y, Baum LG, Bakkers J, Mayo KH, Poirier F, y Griffioen AW (2006) "Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy." *Proc Natl Acad Sci USA* 103(43):15975-15980. 26. Schliemann C, Roesli C, Kamada H, Borgia B, Fugmann T, Klapper W, y Neri D (2010) "In vivo biotinylation of the vasculature in B-cell lymphoma identifies BST-2 as a target for antibody-based therapy." *Blood* 115(3):736-744. 27. Brack SS, Silacci M, Birchler M, y Neri D (2006) "Tumor-targeting properties of novel antibodies specific to the large isoform of tenascin-C." *Clin Cancer Res* 12(10):3200-3208. 28. Rybak J, Roesli C, Kaspar M, Villa A, y Neri D (2007) "The extra-domain A of fibronectin is a vascular marker of solid tumors and metastases." *Cancer Res* 67(22): 10948-10957. 29. Mohandas N y Gallagher PG (2008) "Red cell membrane: past, present, and future." *Blood* 112(10):3939-3948. 30. Rice JJ y Daugherty PS (2008) "Directed evolution of a biterminal bacterial display scaffold enhances the display of diverse peptides." *Protein Eng Des Sel* 21(7):435-442. 31. Dane KY, Chan LA, Rice JJ, y Daugherty PS (2006) "Isolation of cell specific peptide ligands using fluorescent bacterial display libraries." *J Immunol Methods* 309(1-2): 120-129. 32. van der Vlies AJ, O'Neil CP, Hasegawa U, Hammond N, y Hubbell JA (2010) "Synthesis of pyridyl disulfide-functionalized nanoparticles for conjugating thiol-containing small molecules, peptides, and proteins." *Bioconjug Chem* 21(4):653-662. 33. O'Neil CP, van der Vlies AJ, Velluto D, Wandrey C, Demurtas D, Dubochet J, y Hubbell JA (2009) "Extracellular matrix binding mixed micelles for drug delivery applications." *J Control Release* 137(2): 146-151. 34. Velluto D, Demurtas D, y Hubbell JA (2008) "PEG-b-PPS diblock copolymer aggregates for hydrophobic drug solubilization and release: cyclosporin A as an example." *Mol Pharm* 5(4):632-642. 35. Reddy ST, Rehor A, Schmoekel HG, Hubbell JA, y Swartz MA (2006) "In vivo targeting of dendritic cells in lymph nodes with poly(propylene sulfide) nanoparticles." *J Control Release* 112(1):26-34. 36. Reddy ST, van der Vlies AJ, Simeoni E, Angeli V, Randolph GJ, O'Neil CP, Lee LK, Swartz MA, y Hubbell JA (2007) "Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines." *Nat Biotechnol* 25(10): 1159-1164. 37. Kontos S y Hubbell JA (2010) "Improving protein pharmacokinetics by engineering erythrocyte affinity." *Mol. Pharmaceutics* 7(6):2141-2147. 38. Khandelwal S y Saxena RK (2006) "Assessment of survival of aging erythrocyte in circulation and attendant changes in size and CD 147 expression by a novel two step biotinylation method." *Exp Gerontol* 41(9):855-861. 39. Ferguson TA, Choi J, y Green DR (2011) "Armed response: how dying cells influence T-cell functions." *Immunol Rev* 241(1):77-88. 40. Yamazaki S, Dudziak D, Heidkamp GF, Fiorese C, Bonito AJ, Inaba K, Nussenzweig MC, y Steinman RM (2008) "CD8+ CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells." *Journal of immunology* (Baltimore, MD: 1950) 181(10):6923-6933. 41. Holz LE, Warren A, Le Couteur DG, Bowen DG, y Bertolino P (2010) "CD8+ T cell tolerance following antigen recognition on hepatocytes." *Journal of Autoimmunity* 34(1): 15-22. 42. Ichikawa S, Mucida D, Tyznik AJ, Kronenberg M, y Cheroutre H (2011) "Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders." *Journal of immunology* (Baltimore, Md: 1950) 186(10):5549-5555. 43. Thomson AW y Knolle PA (2010) "Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment." *Nat Rev Immunol* 10(11):753-766. 44. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, y Bhardwaj N (1998) "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* 188(7):1359-1368. 45. Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, y Kroemer G (2009) "Immunogenic and tolerogenic cell death." *Nat Rev Immunol* 9(5):353-363. 46. Bursch LS, Rich BE, y Hogquist KA (2009) "Langerhans cells are not required for the CD8 T cell response to epidermal self-antigens." *J Immunol* 182(8):4657-4664. 47. Liu K, Iyoda T, Satemus M, Kimura Y, Inaba K, y Steinman RM (2002) "Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ." *J Exp Med* 196(8): 1091-1097. 48. Darrah PA, Hegde ST, Patel DT, Lindsay RWB, Chen L, Roederer M, y Seder RA (2010) "IL-10 production differentially influences the magnitude, quality, and protective capacity of Th1 responses depending on the vaccine platform." *J Exp Med* 207(7): 1421-1433. 49. Lee MS y Kim Y-J (2007) "Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk." *Annu. Rev. Biochem.* 76:447-480. 50. Arnaboldi PM, Roth-Walter F, y Mayer L (2009) "Suppression of Th1 and Th1 7, but not Th2, responses in a CD8(+) T cell-mediated model of oral tolerance." *Mucosal Immunol* 2(5):427-438. 51. Saint-Lu N, Tourdou S, Razafindratsita A, Mascarell L, Berjont N, Chabre H, Louise A, Van Overtvelt L, y Moingeon P (2009) "Targeting the allergen to oral dendritic cells with mucoadhesive chitosan particles enhances tolerance induction." *Allergy* 64(7): 1003-1013. 52. Mueller DL (2010) "Mechanisms maintaining peripheral tolerance." *Nat Immunol* 11(1):21-27. 53. Lutolf MP, Tirelli N, Cerritelli S, Cavalli L, y Hubbell JA (2001) "Systematic modulation of Michael-type reactivity of thiols through the use of charged amino acids." *Bioconjug Chem* 12(6): 1051-1056. 54. Steiner D, Forrer P, y Plückthun A (2008) "Efficient selection of DARPs with subnanomolar affinities using SRP phage display." *Journal of Molecular Biology* 382(5):1211-1227. 55. Parmeggiani F, Pellarm R, Larsen AP, Varadamsetty G, Stumpp M, Zerbe O, Cafisch A, y Pluckthun A (2008) "Designed armadillo repeat proteins as general peptide-binding scaffolds: consensus design and computational optimization of the hydrophobic core." *Journal of Molecular Biology* 376(5): 1282-1304. 56. Hackel BJ, Kapila A, y Wittrup KD (2008) "Picomolar affinity fibronectin domains engineered utilizing loop length diversity, recursive mutagenesis, and loop shuffling." *J Mol Biol* 381(5): 1238-1252. 57. Silverman AP, Levin AM, Lahti JL, y Cochran JR (2009) "Engineered cystine-knot peptides that bind alpha(v)beta(3) integrin with antibody-like affinities." *Journal of Molecular Biology* 385(4):1064-1075. 58. Keefe AD, Pai S, y Ellington A (2010) "Aptamers as therapeutics." *Nat Rev Drug Discov* 9(7):537-550. 59. Rockey WM, Huang L, Kloepping KC, Baumhover NJ, Giangrande PH, y Schultz MK (2011) "Synthesis and radiolabeling of chelator-RNA aptamer bioconjugates with copper-64 for targeted molecular imaging." *Bioorg Med Chem* 19(13):4080-4090. 60. Savla R, Taratula O, Garbuzenko O, y Minko T (2011) "Tumor targeted quantum dot-mucin 1 aptamer-doxorubicin conjugate for imaging and treatment of cancer." *J Control Release* 153(1): 16-22. 61. Sampson T (2003) "Aptamers and SELEX: the technology." *World Patent Information* (25): 123 -129. 62. Getts DR, Getts MT, McCarthy DP, Chastain EML, y Miller SD (2010). "Have

we overestimated the benefit of human(ized) antibodies?" mAbs 2(6):682-694. 63. Chan AC, Carter PJ (2010) Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. Nature Publishing Group 10:301-316. 64. Getts DR, Getts MT, McCarthy DP, Chastain EML, Miller SD (2010) Have we overestimated the benefit of human(ized) antibodies? MAb 2:682-694. 65. Jiskoot W, van Schie RMF, Carstens MG, Schellekens H (2009) Immunological risk of injectable drug delivery systems. Pharm Res 26:1303-1314. 66. Wang J y otros. (2008) Neutralizing antibodies to therapeutic enzymes: considerations for testing, prevention and treatment. Nat Biotechnol 26:901-908. 67. Cartron JP, Colin Y (2001) Structural and functional diversity of blood group antigens. Transfus Clin Biol 8: 163-199.

Listado de secuencias

<110> Ecole Polytechnique Federale de Lausanne

<120> PRODUCTOS TERAPÉUTICOS DE UNIÓN A LOS ERITROCITOS

<130> 2968.07WO02

<150> 13/206034

<151> 2011-08-09

<160> 128

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de unión a los eritrocitos

<400> 1

Trp Met Val Leu Pro Trp Leu Pro Gly Thr Leu Asp

1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de control

<400> 2

Pro Leu Leu Thr Val Gly Met Asp Leu Trp Pro Trp

1 5 10

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo

<400> 3

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5

<210> 4

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido de unión a los eritrocitos

<400> 4

5 Gly Gln Ser Gly Gln Pro Asn Ser Arg Trp Ile Tyr Met Thr Pro Leu  
 1 5 10 15

Ser Pro Gly Ile Tyr Arg Gly Ser Ser Gly Gly Ser  
 20 25

<210> 5  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Péptido de unión a los eritrocitos

15 <400> 5

Gly Gln Ser Gly Gln Ser Trp Ser Arg Ala Ile Leu Pro Leu Phe Lys  
 1 5 10 15

Ile Gln Pro Val Gly Ser Ser Gly Gly Ser  
 20 25

20 <210> 6  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido de unión a los eritrocitos

<400> 6

Gly Gln Ser Gly Gln Tyr Ile Cys Thr Ser Ala Gly Phe Gly Glu Tyr  
 1 5 10 15

Cys Phe Ile Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser  
 20 25

30 <210> 7  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Péptido de unión a los eritrocitos

40 <400> 7

Gly Gln Ser Gly Gln Thr Tyr Phe Cys Thr Pro Thr Leu Leu Gly Gln  
 1 5 10 15

Tyr Cys Ser Val Gly Ser Ser Gly Gly Ser  
 20 25

45 <210> 8  
 <211> 22  
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de unión a los eritrocitos

5 <400> 8

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Gln | Ser | Gly | His | Trp | His | Cys | Gln | Gly | Pro | Phe | Ala | Asn | Trp | Val |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ser | Ser | Gly | Gly | Ser |
|     |     |     | 20  |     |     |

10 <210> 9

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Péptido de unión a los eritrocitos

<400> 9

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Gln | Ser | Gly | Gln | Phe | Cys | Thr | Val | Ile | Tyr | Asn | Thr | Tyr | Thr | Cys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Pro | Ser | Ser | Gly | Ser | Ser | Gly | Gly | Ser |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |

20 <210> 10

<211> 26

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de unión a los eritrocitos

30 <400> 10

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Gln | Ser | Gly | Gln | Ser | Val | Trp | Tyr | Ser | Ser | Arg | Gly | Asn | Pro | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Cys | Thr | Gly | Gly | Ser | Ser | Gly | Gly | Ser |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |

35 <210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Péptido de unión a los eritrocitos

<400> 11

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Asn | Ser | Arg | Trp | Ile | Tyr | Met | Thr | Pro | Leu | Ser | Pro | Gly | Ile | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |
|-----|
| Arg |
|-----|

45 <210> 12

<211> 15

<212> **PRT**

<213> **Secuencia** artificial

<220>

<223> Péptido de unión a los eritrocitos

5 <400> 12

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Trp | Ser | Arg | Ala | Ile | Leu | Pro | Leu | Phe | Lys | Ile | Gln | Pro | Val |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |

10 <210> 13  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Péptido de unión a los eritrocitos

<400> 13

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Ile | Cys | Thr | Ser | Ala | Gly | Phe | Gly | Glu | Tyr | Cys | Phe | Ile | Asp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |

20 <210> 14

<211> 15  
25 <212> **PRT**  
<213> **Secuencia** artificial

<220>  
<223> Péptido de unión a los eritrocitos

30 <400> 14

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Tyr | Phe | Cys | Thr | Pro | Thr | Leu | Leu | Gly | Gln | Tyr | Cys | Ser | Val |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |

35 <210> 15  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Péptido de unión a los eritrocitos

<400> 15

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Trp | His | Cys | Gln | Gly | Pro | Phe | Ala | Asn | Trp | Val |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |

45 <210> 16  
<211> 15  
<212> PRT  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido de unión a los eritrocitos

55 <400> 16

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Cys | Thr | Val | Ile | Tyr | Asn | Thr | Tyr | Thr | Cys | Val | Pro | Ser | Ser |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |

60 <210> 17  
<211> 15  
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de unión a los eritrocitos

5 <400> 17

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

10 <210> 18  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> conector peptídico

<400> 18

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser  
20 20

<210> 19  
<211> 19  
<212> PRT  
25 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido de unión a los eritrocitos

30 <400> 19

Trp Met Val Leu Pro Trp Leu Pro Gly Thr Leu Asp Gly Gly Ser Gly  
1 5 10 15  
Cys Arg Gly

35 <210> 20  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> péptido de control

<400> 20

Pro Leu Leu Thr Val Gly Met Asp Leu Trp Pro Trp Gly Gly Ser Gly  
1 5 10 15

45 Cys Arg Gly

<210> 21  
<211> 34  
<212> ADN  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador de PCR

55 <400> 21  
agccggccat ggcggayatc cagctgactc agcc 34

5      <210> 22  
       <211> 34  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador de PCR  
 10     <400> 22  
       agccggccat ggcggayatt gttctwccc agtc 34  
       <210> 23  
       <211> 34  
       <212> ADN  
 15     <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador de PCR  
 20     <400> 23  
       agccggccat ggcggayatt gtgntmactc agtc 34  
       <210> 24  
       <211> 34  
 25     <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador de PCR  
 30     <400> 24  
       agccggccat ggcggayatt gtgytracac agtc 34  
       <210> 25  
       <211> 34  
 35     <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador de PCR  
 40     <400> 25  
       agccggccat ggcggayatt gtratgacmc agtc 34  
       <210> 26  
       <211> 34  
       <212> ADN  
 45     <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador de PCR  
 50     <400> 26  
       agccggccat ggcggayatt magatramcc agtc 34  
 55     <210> 27  
       <211> 34  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
 60     <220>  
       <223> Cebador de PCR  
       <400> 27  
 65     agccggccat ggcggayatt cagatgaydc agtc 34

5      <210> 28  
       <211> 34  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador de PCR  
 10      <400> 28  
       agccggccat ggcggayaty cagatgacac agac 34  
       <210> 29  
       <211> 34  
       <212> ADN  
 15      <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador de PCR  
 20      <400> 29  
       agccggccat ggcggayatt gttctcawcc agtc 34  
       <210> 30  
       <211> 34  
 25      <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador de PCR  
 30      <400> 30  
       agccggccat ggcggayatt gwgtsaccc aatc 34  
       <210> 31  
       <211> 34  
 35      <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador de PCR  
 40      <400> 31  
       agccggccat ggcggayatt stratgaccc artc 34  
       <210> 32  
       <211> 34  
 45      <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador de PCR  
 50      <400> 32  
       agccggccat ggcggayrtt ktgatgaccc arac 34  
 55      <210> 33  
       <211> 34  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
 60      <220>  
       <223> Cebador de PCR  
       <400> 33  
 65      agccggccat ggcggayatt gtgatgacbc agkc 34

5      <210> 34  
       <211> 34  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador de PCR  
 10     <400> 34  
       agccggccat ggcggayatt gtgataacyc agga 34  
       <210> 35  
       <211> 34  
       <212> ADN  
 15     <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador de PCR  
 20     <400> 35  
       agccggccat ggcggayatt gtgatgaccc agwt 34  
       <210> 36  
       <211> 34  
 25     <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador de PCR  
 30     <400> 36  
       agccggccat ggcggayatt gtgatgacac aacc 34  
       <210> 37  
       <211> 34  
 35     <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador de PCR  
 40     <400> 37  
       agccggccat ggcggayatt ttgctgactc agtc 34  
       <210> 38  
       <211> 37  
 45     <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador de PCR  
       <400> 38  
 50     agccggccat ggcggargct gttgtgactc aggaatc 37  
       <210> 39  
       <211> 37  
       <212> ADN  
 55     <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Cebador de PCR  
       <400> 39  
 60     gatggtcgg ccgcagtacg ttgtattcc agcttgg 37  
 65     gatggtcgg ccgcagtacg ttgtattcc agcttgg 37

5 <210> 40  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 10 <400> 40  
 gatggtgcgg ccgcagtacg tttatttc agcttg 37  
 <210> 41  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 20 <400> 41  
 gatggtgcgg ccgcagtacg tttatttc aacttg 37  
 <210> 42  
 <211> 37  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 30 <400> 42  
 gatggtgcgg ccgcagtacg ttcagctcc agcttg 37  
 <210> 43  
 <211> 37  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 40 <400> 43  
 gatggtgcgg ccgcagtacc taggacagtc agtttg 37  
 <210> 44  
 <211> 37  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 50 <400> 44  
 gatggtgcgg ccgcagtacc taggacagtg accttg 37  
 <210> 45  
 <211> 51  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 60 <400> 45  
 gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc ggakgtrmag cttcaggagt c 51  
 65 <210> 46

<211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 46  
 10 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggaggtbcag ctbcagcagt c 51  
 <210> 47  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 47  
 20 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc gcaggtgcag ctgaagsast c 51  
 <210> 48  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 30 <400> 48  
 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggaggtccar ctgcaacart c 51  
 <210> 49  
 <211> 51  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 40 <400> 49  
 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc gcaggtycag ctbcagcart c 51  
 <210> 50  
 45 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> Cebador de PCR  
 <400> 50  
 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc gcaggtycag ctbcagcart c 51  
 55 <210> 51  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 51  
 65 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc gcaggtycar ctgcagcagt c 51  
 <210> 52

<211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 52  
 10 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc gcaggtccac gtgaagcagt c 51  
 <210> 53  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 53  
 20 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggaggtgaas stggtggaat c 51  
 <210> 54  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 30 <400> 54  
 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggavgtgawg ytggtggagt c 51  
 <210> 55  
 <211> 51  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 40 <400> 55  
 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggaggtgcag skggtggagt c 51  
 <210> 56  
 45 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> Cebador de PCR  
 <400> 56  
 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggakgtgcam ctggtggagt c 51  
 55 <210> 57  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 57  
 65 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggaggtgaag ctgatggart c 51  
 <210> 58

<211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 58  
 10 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggaggtgcar ctgttgagt c 51  
 <210> 59  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 59  
 20 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggargtraag ctctcgagt c 51  
 <210> 60  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 30 <400> 60  
 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggaagtgaar sttgaggagt c 51  
 <210> 61  
 <211> 53  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 40 <400> 61  
 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc gcaggttact ctraaagwgt stg 53  
 <210> 62  
 45 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> Cebador de PCR  
 <400> 62  
 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc gcaggtcaa ctvcagarc c 51  
 55 <210> 63  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 63  
 65 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggatgtgaac ttggaagtgt c 51  
 <210> 64

<211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 64  
 gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc ggaggtgaag gtcacgagt c 51  
 10 <210> 65  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 65  
 cccttgaagc ttgctgagga aacggtgacc gtggt 35  
 20 <210> 66  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 66  
 30 cccttgaagc ttgctgagga gactgtgaga gtggt 35  
 <210> 67  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 67  
 40 cccttgaagc ttgctgcaga gacagtgacc agagt 35  
 <210> 68  
 <211> 35  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 50 <400> 68  
 cccttgaagc ttgctgagga gacggtgact gaggt 35  
 <210> 69  
 <211> 747  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Ter 119 scFv  
 60 <400> 69

# ES 2 781 773 T3

|    |                                                                       |     |
|----|-----------------------------------------------------------------------|-----|
|    | gaggtgaagc tgcaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctgggggggc tctgaaactc     | 60  |
|    | tcctgtgtag cctcaggatt cactttcagg gaccactgga tgaattgggt ccggcaggct     | 120 |
|    | cccggaaaga ccatggagtg gattggagat attagacctg atggcagtg cacaactat       | 180 |
|    | gcaccatctg tgaggaatag attcacaatc tccagagaca atgccaggag catcctgtac     | 240 |
|    | ctgcagatga gcaatatgag atctgattac acagccactt attactgtgt tagagactca     | 300 |
|    | cctacccggg ctgggcttat ggatgcctgg ggtcaaggaa cctcagtcac tgtctcctca     | 360 |
|    | gccggtggtg gtggttcttg tgggtggtgt tctggcggcg gcggctccgg tgggtggtgga    | 420 |
|    | tccgacattc agatgacgca gtctccttca gtctgtctg catctgtggg agacagagtc      | 480 |
|    | actctcaact gcaaagcaag tcagaatatt aacaagtact taaactggta tcagcaaaag     | 540 |
|    | cttggagaag ctcccaaagt cctgatatat aatacaaaca atttgcaaac gggcatcca      | 600 |
|    | tcaaggttca gtggcagtg atctgttaca gatttcacac tcaccatcag tagcctgcag      | 660 |
|    | cctgaagatt ttgccacata tttctgcttt cagcattata cttggccac gtttggaggt      | 720 |
|    | gggaccaagc tggaaatcaa acgtact                                         | 747 |
| 5  | <210> 70<br><211> 45<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial       |     |
| 10 | <220><br><223> Cebador de PCR                                         |     |
|    | <400> 70<br>actcgcggcc cagccggcca tggcggaggt gaagctgcag gagtc 45      |     |
| 15 | <210> 71<br><211> 65<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial       |     |
| 20 | <220><br><223> Cebador de PCR<br><400> 71                             |     |
|    | ggagccgccc ccgccagaac caccaccacc agaaccacca ccaccggctg aggagacagt     | 60  |
| 25 | gactg                                                                 | 65  |
|    | <210> 72<br><211> 50<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial       |     |
| 30 | <220><br><223> Cebador de PCR                                         |     |
| 35 | <400> 72<br>ggcggcggcg gctccggtgg tgggtgatcc gacattcaga tgacgcagtc 50 |     |
| 40 | <210> 73<br><211> 41<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial       |     |
|    | <220><br><223> Cebador de PCR                                         |     |

ES 2 781 773 T3

<400> 73  
 gactactagg cccccgaggc cagtacgttt gatttcagc t 41

5 <210> 74  
 <211> 793  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> 10F7 scFv

<400> 74

|            |            |            |             |            |             |     |
|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|-----|
| gttattactc | gcggcccagc | cggccatggc | ggcgcaggtg  | aaactgcagc | agagcggcgc  | 60  |
| ggaactggtg | aaaccgggcg | cgagcgtgaa | actgagctgc  | aaagcgagcg | gctatacctt  | 120 |
| taacagctat | tttatgcatt | ggatgaaaca | gcgcccgggtg | cagggccttg | aatggattgg  | 180 |
| catgattcgc | ccgaacggcg | gcaccaccga | ttataacgaa  | aaatttaaaa | acaaagcgac  | 240 |
| cctgaccgtg | gataaaagca | gcaacaccgc | gtatatgcag  | ctgaacagcc | tgaccagcgg  | 300 |
| cgatagcgcg | gtgtattatt | gcgcgcgctg | ggaaggcagc  | tattatgcgc | tggtattattg | 360 |
| gggccagggc | accaccgtga | ccgtgagcag | cggcggcggc  | ggcagcggcg | gcggcggcag  | 420 |
| cggcggcggc | ggcagcgata | ttgaactgac | ccagagcccg  | gcgattatga | gcgcgaccct  | 480 |
| gggcgaaaaa | gtgaccatga | cctgccgcgc | gagcagcaac  | gtgaaatata | tgtattggta  | 540 |
| tcagcagaaa | agcggcgcg  | gcccgaact  | gtggatttat  | tataccagca | acctggcgag  | 600 |
| cggcgtgccg | ggccgcttta | gcggcgagcg | cagcggcacc  | agctatagcc | tgaccattag  | 660 |
| cagcgtggaa | gcggaagatg | cggcgacct  | ttattgccag  | cagtttacca | gcagcccgt   | 720 |
| tacctttggc | ggcggcacca | aactggaaat | taaacgcgcg  | gcggcggcct | cgggggccga  | 780 |
| gggcggcggg | tct        |            |             |            |             | 793 |

15 <210> 75  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> epítipo

<400> 75

25 Ser Gly Leu Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu  
 1 5 10 15

30 <210> 76  
 <211> 819  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> proteína de fusión

35 <400> 76

# ES 2 781 773 T3

|    |                                                                                |     |
|----|--------------------------------------------------------------------------------|-----|
|    | gaggtgaagc tgcaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctgggggggtc tctgaaactc             | 60  |
|    | tcctgtgtag cctcaggatt cactttcagg gaccactgga tgaattgggt ccggcaggct              | 120 |
|    | cccgaaaga ccatggagtg gattggagat attagacctg atggcagtga cacaaactat               | 180 |
|    | gcaccatctg tgaggaatag attcacaatc tccagagaca atgccaggag catcctgtac              | 240 |
|    | ctgcagatga gcaatatgag atctgattac acagccactt attactgtgt tagagactca              | 300 |
|    | cctacccggg ctgggcttat ggatgcctgg ggtcaaggaa cctcagtcac tgtctcctca              | 360 |
|    | gccggtggtg gtggttcttg tgggtggtggt tctggcggcg gcggctccgg tgggtggtgga            | 420 |
|    | tccgacattc agatgacgca gtctccttca gtctgtctg catctgtggg agacagagtc               | 480 |
|    | actctcaact gcaaagcaag tcagaatatt aacaagtact taaactggta tcagcaaaag              | 540 |
|    | cttgagagaag ctcccaaagt cctgatatat aatacaaaca atttgcaaac gggcatccca             | 600 |
|    | tcaaggttca gtggcagtgg atctggtaca gatttcacac tcaccatcag tagcctgcag              | 660 |
|    | cctgaagatt ttgccacata tttctgcttt cagcattata cttggccac gtttgagggt               | 720 |
|    | gggaccaagc tggaaatcaa acgtactcat catcaccatc atcacggtgg cggttctggc              | 780 |
|    | ctggagcagc tggagtctat tattaatttc gaaaaactg                                     | 819 |
| 5  | <210> 77<br><211> 10<br><212> PRT<br><213> Secuencia artificial                |     |
| 10 | <220><br><223> parte del anticuerpo<br><br><400> 77                            |     |
| 15 | Tyr Val Arg Pro Leu Trp Val Arg Met Glu<br>1 5 10                              |     |
|    | <210> 78<br><211> 804<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial               |     |
| 20 | <220><br><223> proteína de fusión                                              |     |
| 25 | <400> 78<br>gaggtgaagc tgcaggagtc aggaggaggc ttggtgcaac ctgggggggtc tctgaaactc | 60  |
|    | tcctgtgtag cctcaggatt cactttcagg gaccactgga tgaattgggt ccggcaggct              | 120 |
|    | cccgaaaga ccatggagtg gattggggat attagacctg atggcagtga cacaaactat               | 180 |
|    | gcaccatctg tgaggaatag attcacaatc tccagagaca ataccaggag catcctgtac              | 240 |
|    | ctgcagatgg gcaatatgag atctgattac acagccactt attactgtgt tagagactca              | 300 |
|    | cctacccggg ctgggcttat ggatgcctgg ggtcaaggaa cctcagtcac tgtctcctca              | 360 |
|    | gccggtggtg gtggttcttg tgggtggtggt tctggcggcg gcggctccgg tgggtggtgga            | 420 |
|    | tccgacattc agatgacgca gtctccttca gtctgtctg catctgtggg agacagagtc               | 480 |
|    | actctcaact gcaaagcaag tcagaatatt aacaagtact taaaccggta tcagcaaaag              | 540 |
|    | cttgagagaag ctcccaaagt cctggtatat aatacaaaca atttgcaaac gggcatccca             | 600 |

# ES 2 781 773 T3

|    |                                                                                |      |
|----|--------------------------------------------------------------------------------|------|
|    | tcaaggttca gtggcagtgg atctggcaca gatttcacac tcaccatcag tagcctgcag              | 660  |
|    | cctgaagatt ttgccacata tttctgcttt cagcattata cttggcccac gtttggaggt              | 720  |
|    | gtgaccaagc tggaaatcaa acgtactcat catcaccatc atcacggtgg cggttatgtc              | 780  |
|    | agacctctgt gggtcagaat ggaa                                                     | 804  |
| 5  | <210> 79<br><211> 1026<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial              |      |
| 10 | <220><br><223> proteína de fusión                                              |      |
|    | <400> 79<br>gaggtgaagc tgcaggagtc aggaggaggc ttggtgcaac ctgggggggtc tctgaaactc | 60   |
|    | tcctgtgtag cctcaggatt cactttcagg gaccactgga tgaattgggt ccggcaggct              | 120  |
|    | cccggaaaga ccatggagtg gattggagat attagacctg atggcagtga cacaaactat              | 180  |
|    | gcaccatctg tgaggaatag attcacaatc tccagagaca atgccaggag catcctgtac              | 240  |
|    | ctgcagatga gcaatatgag atctgattac acagccactt attactgtgt tagagactca              | 300  |
|    | cctacccggg ctgggcttat ggatgcctgg ggtcaaggaa cctcagtcac tgtctcctca              | 360  |
|    | gccggtggtg gtggttcttg tgggtggtgg tctggcggcg gcggctccgg tgggtggtgga             | 420  |
|    | tccgacattc agatgacgca gtctccttca gtctgtctg catctgtggg agacagagtc               | 480  |
|    | actctcaact gcaaagcaag tcagaatatt aacaagtact taaactggta tcagcaaaag              | 540  |
|    | cttggagaag ctcccaaagt cctgatatat aatacaaaca atttgcaaac ggcatccca               | 600  |
|    | tcaaggttca gtggcagtgg atctgttaca gatttcacac tcaccatcag tagcctgcag              | 660  |
|    | cctgaagatt ttgccacata tttctgctct cagcattata cttggcccac gtttgatggt              | 720  |
|    | gggaccaagc tggaaatcaa acgtactcat catcaccatc atcacggtgg cggttttgtg              | 780  |
|    | aaacagcatc tgtgcggtcc gcatctggtg gaagcgctgt atctggtgtg cggcgaacgt              | 840  |
|    | ggcttttttt ataccccgaa aagccgtcgt gaagtggaag atccgcaggt ggaacagctg              | 900  |
|    | gaactgggcg gcagcccggtg tgatctgcag accctggccc tggaagtggc gcgtcagaaa             | 960  |
|    | cgtggcattg tggatcagtg ctgcaccagc atttgcagcc tgtatcagct ggaaaactat              | 1020 |
|    | tacaac                                                                         | 1026 |
| 15 | <210> 80<br><211> 17<br><212> PRT<br><213> Secuencia artificial                |      |
| 20 | <220><br><223> scFv                                                            |      |
|    | <400> 80                                                                       |      |
|    | Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly                |      |
|    | 1 5 10 15                                                                      |      |
| 25 | Arg                                                                            |      |
|    | <210> 81                                                                       |      |

<211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 81  
 10 agccggccat ggcggayatc cagctgactc agcc 34  
 <210> 82  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 82  
 20 agccggccat ggcggayatt gttctwccc agtc 34  
 <210> 83  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 30 <400> 83  
 agccggccat ggcggayatt gtgmtmactc agtc 34  
 <210> 84  
 <211> 34  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 84  
 agccggccat ggcggayatt gtgytracac agtc 34  
 <210> 85  
 45 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> Cebador  
 <400> 85  
 agccggccat ggcggayatt gtratgacmc agtc 34  
 55 <210> 86  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 86  
 65 agccggccat ggcggayatt magatramcc agtc 34  
 <210> 87

<211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 87  
 10 agccggccat ggcggayatt cagatgaydc agtc 34  
 <210> 88  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 88  
 20 agccggccat ggcggayaty cagatgacac agac 34  
 <210> 89  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 30 <400> 89  
 agccggccat ggcggayatt gttctawcc agtc 34  
 <210> 90  
 <211> 34  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 90  
 agccggccat ggcggayatt gwgctsaccc aatc 34  
 <210> 91  
 45 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> Cebador  
 <400> 91  
 agccggccat ggcggayatt stratgaccc artc 34  
 55 <210> 92  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 92  
 65 agccggccat ggcggayrtt ktgatgaccc arac 34  
 <210> 93

<211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 93  
 10 agccggccat ggccggayatt gtgatgacbc agkc 34  
 <210> 94  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 94  
 20 agccggccat ggccggayatt gtgataacyc agga 34  
 <210> 95  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 30 <400> 95  
 agccggccat ggccggayatt gtgatgaccc agwt 34  
 <210> 96  
 <211> 34  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 96  
 agccggccat ggccggayatt gtgatgacac aacc 34  
 <210> 97  
 45 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> Cebador  
 <400> 97  
 agccggccat ggccggayatt ttgtgactc agtc 34  
 55 <210> 98  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 98  
 65 agccggccat ggccggargct gttgtgactc aggaatc 37  
 <210> 99

<211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 99  
 gatggtgcgg ccgcagtagc ttgtattcc agcttgg 37  
 10 <210> 100  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 100  
 20 gatggtgcgg ccgcagtagc ttttattcc agcttgg 37  
 <210> 101  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 101  
 30 gatggtgcgg ccgcagtagc ttttattcc aacttgg 37  
 <210> 102  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 102  
 40 gatggtgcgg ccgcagtagc ttgcagctcc agcttgg 37  
 <210> 103  
 <211> 37  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 103  
 50 gatggtgcgg ccgcagtacc taggacagtc agtttgg 37  
 <210> 104  
 <211> 37  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 60 <400> 104  
 gatggtgcgg ccgcagtacc taggacagtg accttgg 37  
 <210> 105  
 65 <211> 51  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 5 <400> 105  
 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggakgtmag cttcaggagt c 51  
 <210> 106  
 10 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador  
 <400> 106  
 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggaggtbcag ctbcagcagt c 51  
 20 <210> 107  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 107  
 30 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc gcaggtgcag ctgaagsast c 51  
 <210> 108  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 108  
 40 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggaggtccar ctgcaacart c 51  
 <210> 109  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 50 <400> 109  
 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc gcaggtycag ctbcagcart c 51  
 <210> 110  
 <211> 51  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 60 <400> 110  
 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc gcaggtycar ctgcagcagt c 51  
 <210> 111  
 65 <211> 51  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 5 <400> 111  
 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc gcaggtccac gtgaagcagt c 51  
 <210> 112  
 10 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador  
 <400> 112  
 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggaggtgaas stggtggaat c 51  
 20 <210> 113  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 113  
 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggavgtgawg ytggtggagt c 51  
 30 <210> 114  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 114  
 40 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggaggtgcag skggtggagt c 51  
 <210> 115  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 50 <400> 115  
 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggakgtgcam ctggtggagt c 51  
 <210> 116  
 <211> 51  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 60 <400> 116  
 gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggaggtgaag ctgatggart c 51  
 <210> 117  
 65 <211> 51  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

5 <400> 117  
gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggaggtgcar cttgttgagt c 51

10 <210> 118  
<211> 51  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador

<400> 118  
gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggargtraag cttctcgagt c 51

20 <210> 119  
<211> 51  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Cebador

<400> 119  
gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggaagtgaar sttgaggagt c 51

30 <210> 120  
<211> 53  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Cebador

<400> 120  
gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc gcaggttact ctraaagwgt stg 53

40 <210> 121  
<211> 51  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Cebador

50 <400> 121  
gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggatgtgaac ttggaagtgt c 51

<210> 122  
<211> 51  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Cebador

60 <400> 122  
gttattgcta gcggtcagc cggcaatggc ggatgtgaac ttggaagtgt c 51

<210> 123  
<211> 51  
<212> ADN

65

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 5 <400> 123  
 gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc ggaggtgaag gtcacgagt c 51  
 10 <210> 124  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 124  
 cccttgaagc ttgctgagga aacggtgacc gtggt 35  
 20 <210> 125  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 125  
 cccttgaccc ttgaagcttg ctgcagagac agtgaccaga gtagcttgct gaggagactg 60  
 30 tgagagtgggt 70  
 <210> 126  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 126  
 cccttgaagc ttgctgcaga gacagtgacc agagt 35  
 <210> 127  
 <211> 35  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 50 <400> 127  
 cccttgaagc ttgctgagga gacggtgact gaggt 35  
 <210> 128  
 <211> 19  
 55 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 60 <223> Ligando  
 <400> 128

## ES 2 781 773 T3

Trp Met Val Leu Pro Trp Leu Pro Gly Thr Leu Asp Gly Gly Ser Gly  
1 5 10 15

Cys Arg Gly

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende:  
un antígeno;  
un grupo de unión a los eritrocitos, en donde el grupo de unión a los eritrocitos es un ligando peptídico que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17;  
en donde el grupo de unión a los eritrocitos se une covalentemente al antígeno.
2. La composición farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 1, en donde el antígeno se selecciona de los grupos:
  - a. insulina, proinsulina, preproinsulina, ácido glutámico descarboxilasa-65 (GAD-65), GAD-67, proteína 2 asociada a insulinoma (IA-2), proteína 2β asociada a insulinoma (IA-2β), ICA69, ICA12 (SOX-13), carboxipeptidasa H, Imogen 38, GLIMA 38, cromogranina-A, HSP-60, carboxipeptidasa E, periferina, transportador de glucosa 2, proteína asociada a pancreatitis/hepatocarcinoma-intestino-páncreas, S100β, proteína ácida fibrilar glial, gen regenerador II, homeobox duodenal pancreático 1, quinasa de la distrofia miotónica, proteína relacionada con la subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa específica de los islotes y receptores 1-5 acoplados a la proteína G SST;
  - b. tiroglobulina (TG), peroxidasa tiroidea (TPO), receptor de tirotropina (TSHR), simportador yodo-sodio (NIS) y megalina;
  - c. tiroglobulina (TG), peroxidasa tiroidea (TPO), receptor de tirotropina (TSHR), simportador yodo-sodio (NIS), megalina y receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1;
  - d. receptor sensible al calcio;
  - e. 21-hidroxilasa, 17α-hidroxilasa, enzima de escisión de la cadena lateral P450 (P450<sub>sc</sub>), receptor de ACTH, P450<sub>c21</sub> y P450<sub>c17</sub>;
  - f. receptor de FSH y α-enolasa,
  - g. factor de proteína específica de la glándula pituitaria (PGSF) 1a, PGSF 2 y yodotironina deiodinasa tipo 2;
  - h. proteína básica de mielina, glucoproteína oligodendrocítica de mielina y proteína proteolípida;
  - i. colágeno II
  - j. H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa;
  - k. factor intrínseco;
  - l. transglutaminasa tisular y gliadina;
  - m. tirosinasa y proteínas 1 y 2 relacionadas con tirosinasa;
  - n. receptor de acetilcolina;
  - o. desmogleína 3, desmogleína 4, penfaxina, desmocolinas, placoglobina, perplaquina, desmoplaquinas y receptor de acetilcolina;
  - p. BP180, BP230, plectina y laminina 5;
  - q. endomisio y transglutaminasa tisular;
  - r. colágeno VII;
  - s. metaloproteínasa de la matriz 1 y 3, la chaperona molecular específica de colágeno proteína 47 de choque térmico, fibrilina-1, receptor PDGF, Scl-70, U1 RNP, Th/To, Ku, Jo1, NAG-2, proteínas de centrómero, topoisomerasa I, proteínas nucleolares, ARN polimerasa I, II y III, PM-S1c, fibrilarina y B23;
  - t. U1snRNP;
  - u. SS-A, SS-B, fodrina, poli(ADP-ribosa) polimerasa y topoisomerasa
  - v. SS-A, grupo 1 de alta movilidad (HMGB1), nucleosomas, proteínas histonas y ADN bicatenario
  - w. proteínas de la membrana basal glomerular, incluido el colágeno IV
  - x. miosina cardíaca; y
  - y. L-aminoácidos aromáticos descarboxilasa, histidina descarboxilasa, ácido cisteín sulfínico descarboxilasa, triptófano hidroxilasa, tirosina hidroxilasa, fenilalanina hidroxilasa, citocromos P450 hepáticos P450A2 y 2A6, SOX-9, SOX-10, receptor sensible al calcio, e interferones de tipo 1 interferón alfa, beta y omega;
  - z. antitrombina-III, proteína C, factor VIII, factor IX, hormona del crecimiento, somatotropina, insulina, acetato de pramlintida, mecasermina (IGF-1), β-glucocerebrosidasa, alglucosidasa-α, laronidasa (α-L-iduronidasa), idursulfasa (iduronato-2-sulfatasa), galsulfasa, agalsidasa-β (α-galactosidasa), inhibidor de la proteínasa α-1 y albúmina;
  - aa. adenosina desaminasa, lipasa pancreática, amilasa pancreática, lactasa, toxina botulínica tipo A, toxina botulínica tipo B, collagenasa, hialuronidasa, papaína, L-asparaginasa, uricasa, lepirudina, estreptoquinasa, anistreplasa (complejo activador plasminógeno estreptoquinasa acilado), globulina antitumófica, Fab inmunitario polivalente de crotalidae, Fab de suero inmunitario de digoxina, L-arginasa y L-metionasa;
  - bb. conarachina (Ara h 1), alérgeno II (Ara h 2), aglutinina de arachis, conglutina (Ara h 6), proteína homóloga de resistencia a enfermedades/alérgeno principal 31 kda (Mal d 2), proteína de transferencia de lípidos (Mal d 3), alérgeno principal Mal d 1,03D (Mal d 1), α-lactalbúmina (ALA), lactotransferrina, actinidina (Act c 1, Act d 1), fitocistatina, proteína similar a la taumatina (Act d 2), kiwelina (Act d 5), albúmina 2S (Sin a 1), globulina 11S (Sin a 2), proteína de transferencia de lípidos (Sin a 3), profilina (Sin a 4), profilina (Api g 4), glucoproteína de alto peso molecular (Api g 5), alérgeno Pen a 1 (Pen a 1), alérgeno Pen m 2 (Pen m 2), isoforma rápida de tropomiosina, glutenina de alto peso molecular, glutenina de bajo peso molecular, alfa y gamma-gliadina, hordeína, secalina, avenina, alérgeno principal de la fresa Fra a 1-E (Fra a 1) y profilina (Mus xp 1); y

cc. subunidades de proteínas de haplotipo MHC clase I y MHC clase II, y polimorfismos de un solo aminoácido en los antígenos menores de los grupos sanguíneos, incluidos RhCE, Kell, Kidd, Duffy y Ss.

- 5 3. La composición farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 1 o 2, en donde el antígeno se une al grupo de unión a los eritrocitos directamente o a través de un conector.
4. La composición farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 3, en donde el conector se selecciona del grupo que consiste en un péptido, un polímero, un aptámero, un ácido nucleico o una partícula.
- 10 5. La composición farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 4, en donde el polímero es un polímero ramificado.
6. La composición farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5 para el uso en el  
15 tratamiento de una afección patológica que se selecciona del grupo que consiste en rechazo de trasplante, enfermedad autoinmunitaria, alergia alimentaria y respuesta inmunitaria no deseada contra un agente terapéutico.
7. La composición farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5 para el uso en el  
20 tratamiento de una afección patológica que se selecciona del grupo que consiste en diabetes mellitus tipo 1; enfermedades autoinmunitarias de la tiroides, incluidas la tiroiditis de Hashimoto y la enfermedad de Graves; oftalmopatía y dermatopatía asociada a tiroides; hipoparatiroidismo; la enfermedad de Addison; falla ovárica prematura; hipofisitis autoinmunitaria o enfermedad autoinmunitaria de la hipófisis; esclerosis múltiple; artritis reumatoide; inmunogastritis; anemia perniciosa; enfermedad celíaca; vitiligo; miastenia gravis; pénfigo vulgar y sus variantes; penfigoide ampolloso; dermatitis herpetiforme de Duhring; epidermólisis ampollosa adquirida; esclerosis sistémica; enfermedad mixta del tejido conectivo; síndrome de Sjogren; lupus eritematoso sistémico; síndrome de Goodpasture; enfermedad reumática del corazón; y síndrome poliglandular autoinmunitario tipo 1.  
25

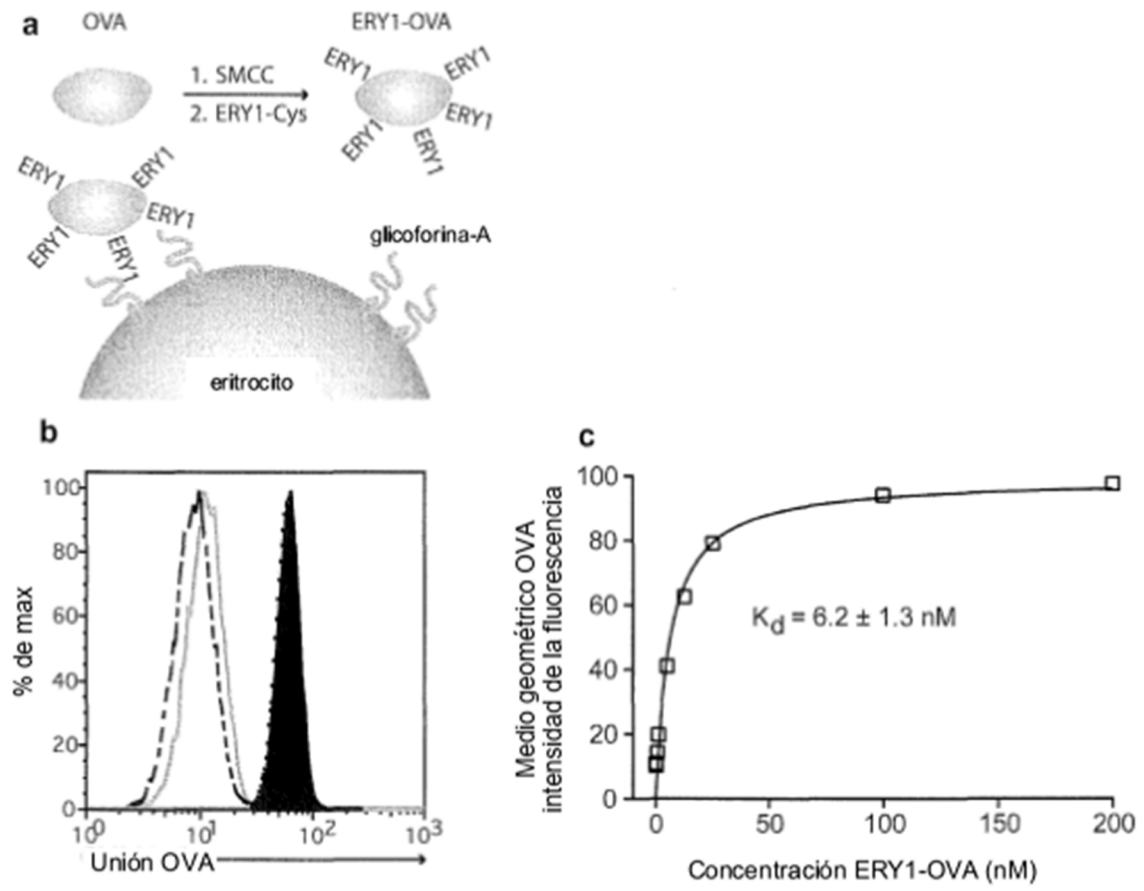


Figura 1

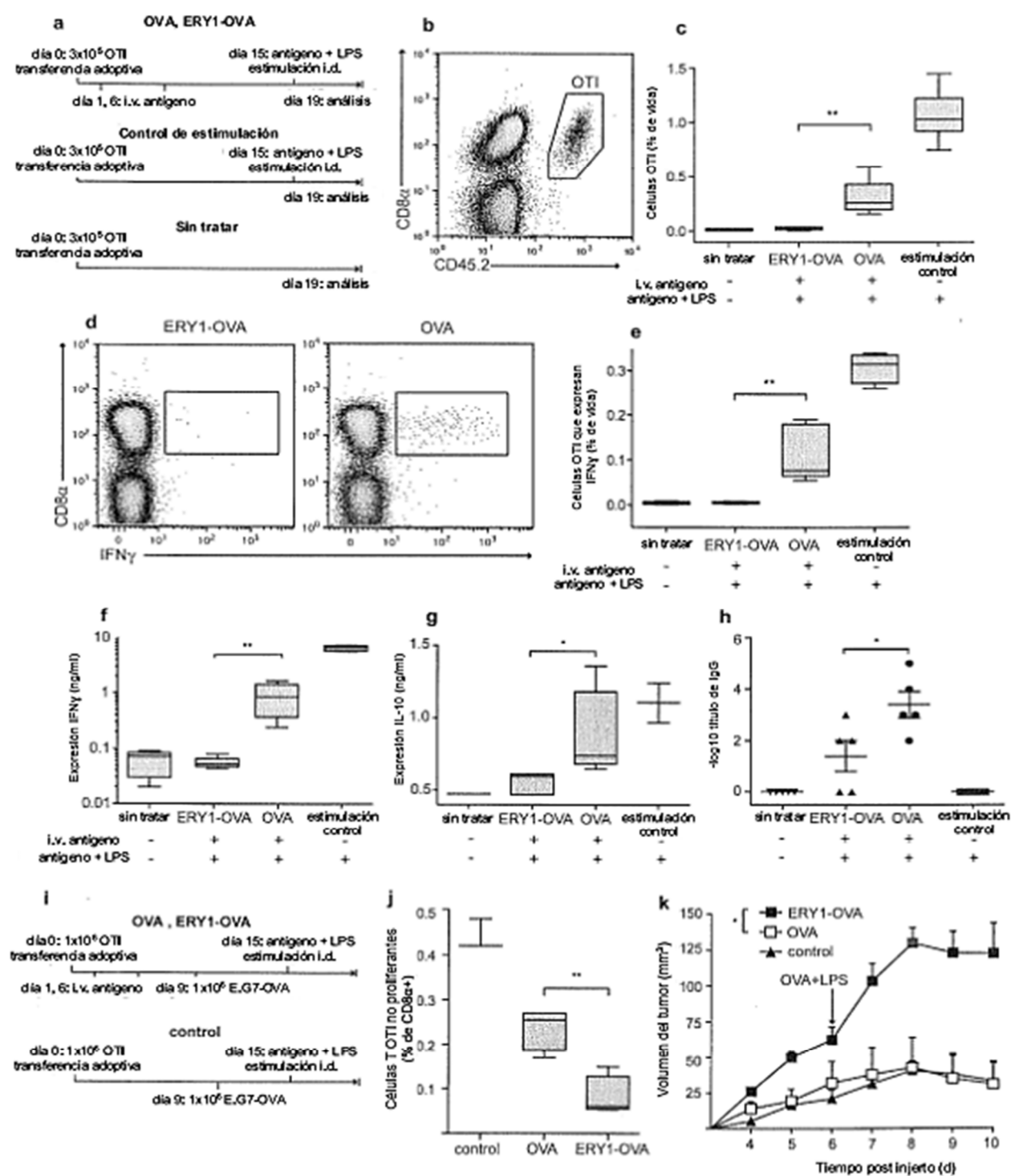


Figura 2

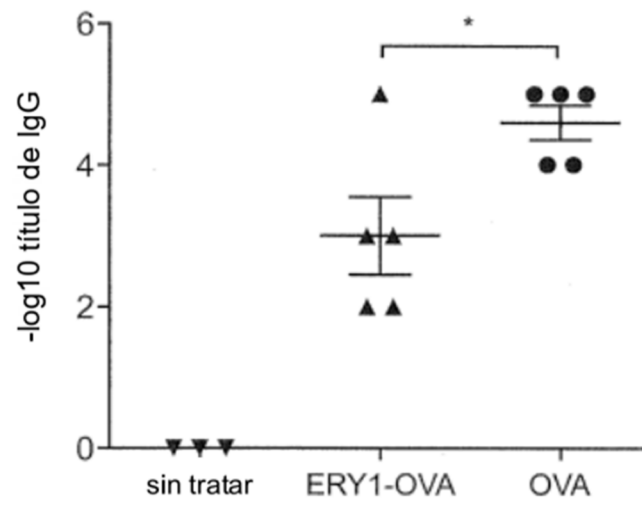


Figura 3

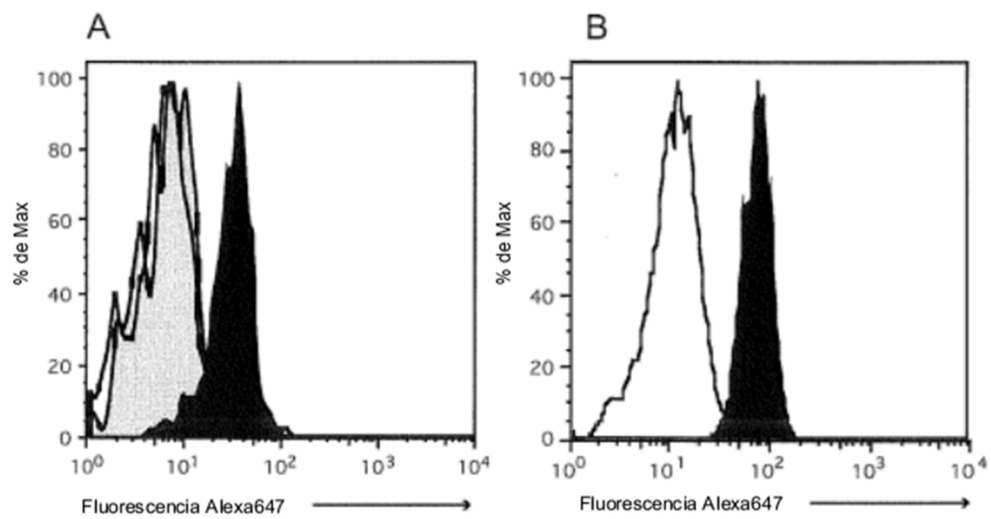


Figura 4

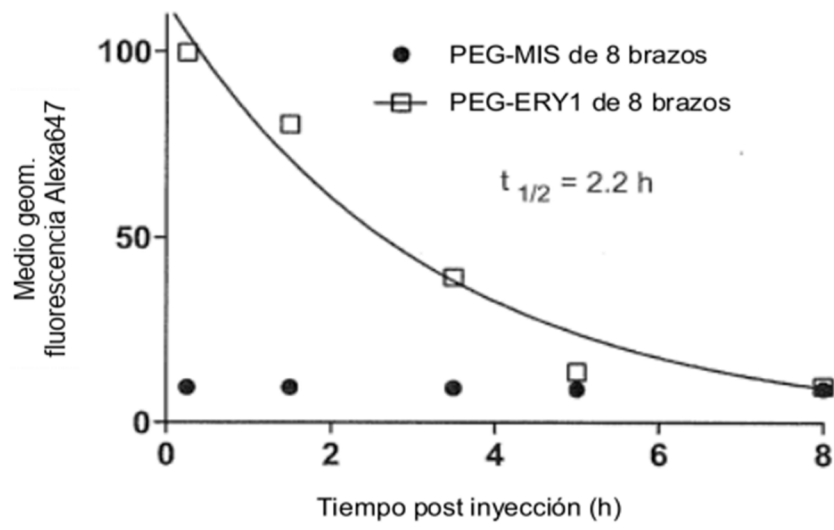


Figura 5

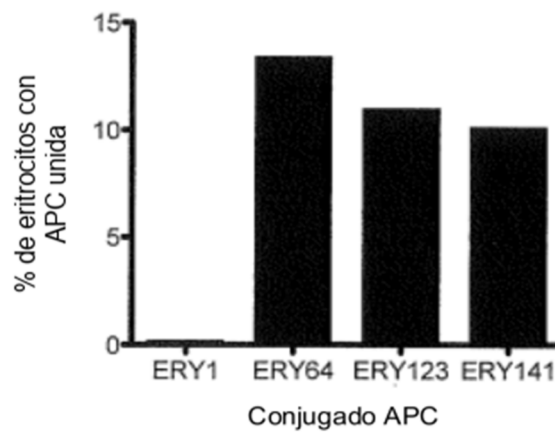


Figura 6

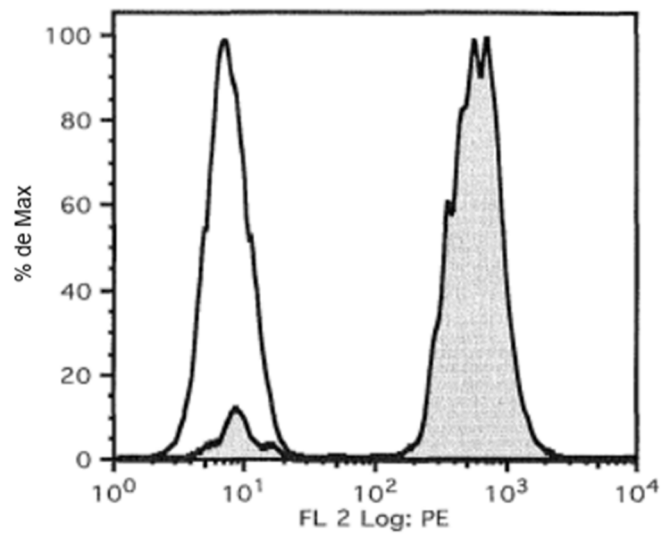


Figura 7

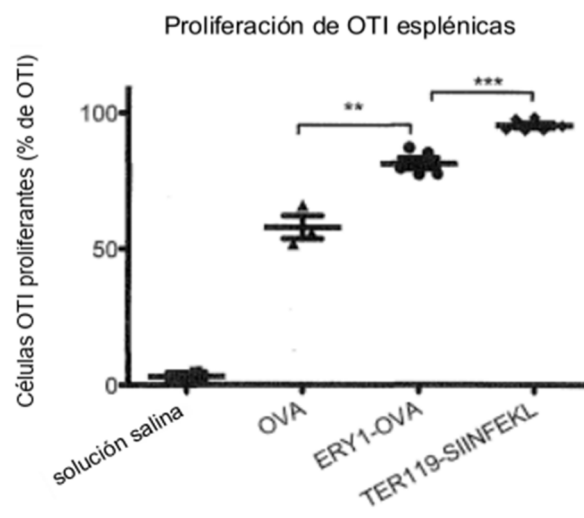


Figura 8

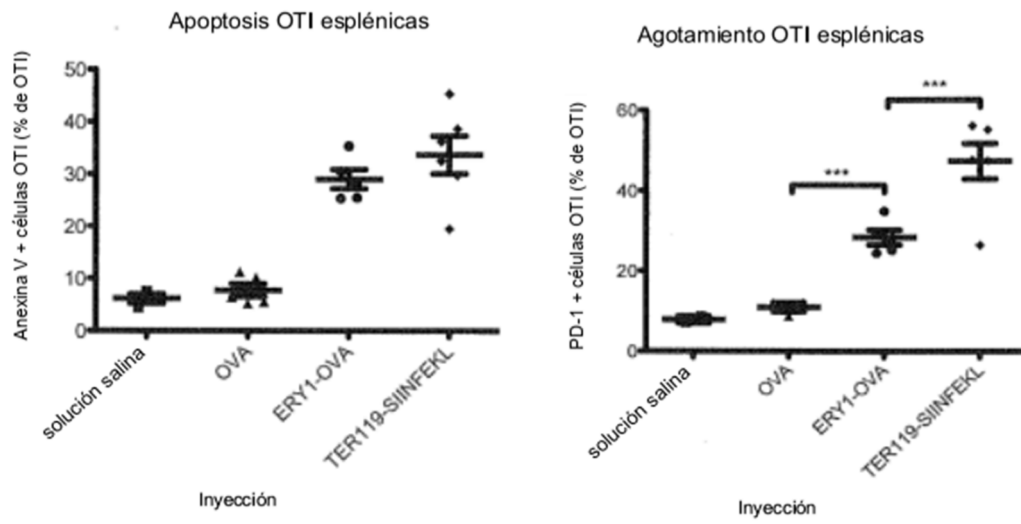


Figura 9

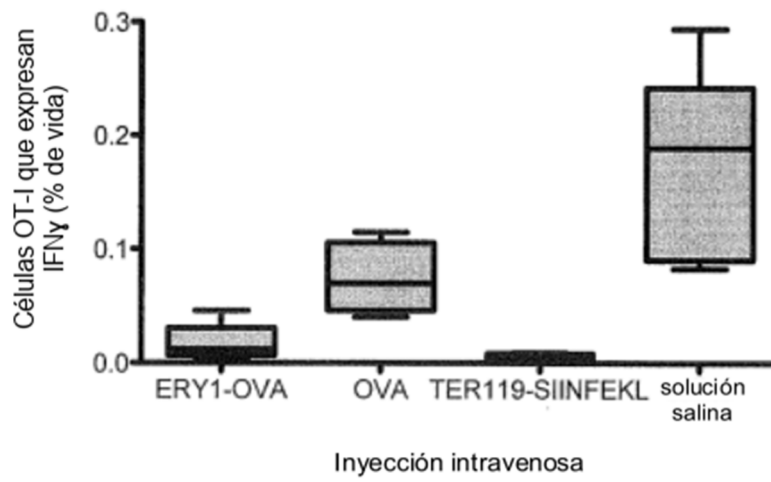


Figura 10

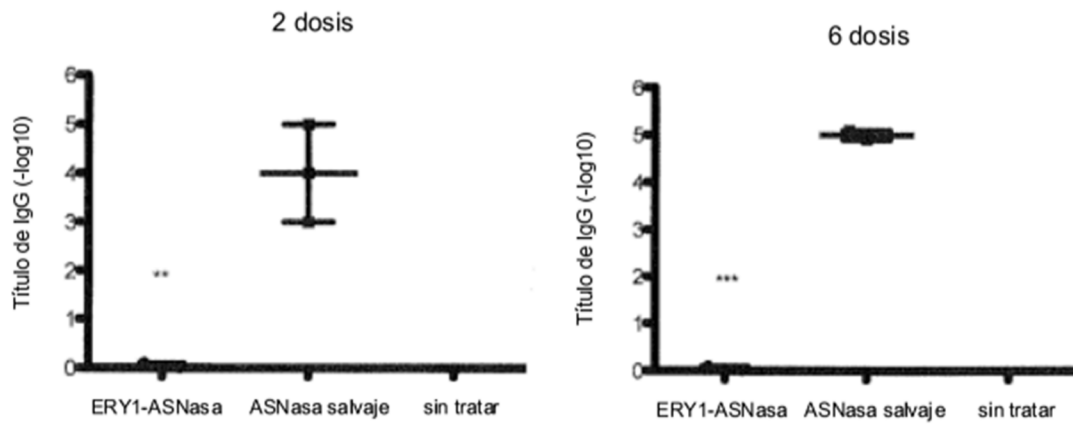


Figura 11

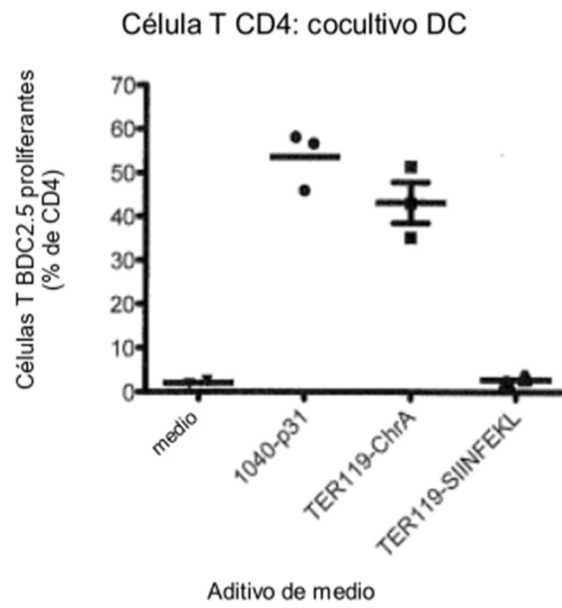


Figura 12

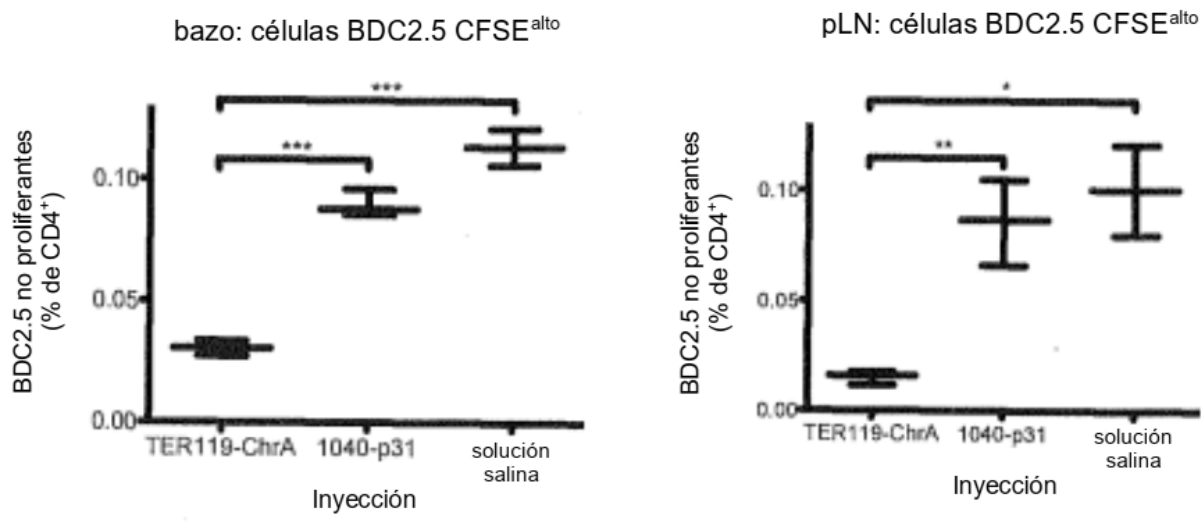


Figura 13