

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 026 667**

51 Int. Cl.:

A61K 31/436	(2006.01) C07K 14/575	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01) C07K 16/18	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01) C07K 14/47	(2006.01)
A61P 19/02	(2006.01)	
A61P 37/00	(2006.01)	
A61K 38/13	(2006.01)	
A61K 39/00	(2006.01)	
A61K 39/39	(2006.01)	
A61K 9/127	(2015.01)	
A61K 9/51	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2014** **E 20186198 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2025** **EP 3858348**

54 Título: **Administración repetida de inmunoterapéuticos específicos de antígeno no inmunosupresores**

30 Prioridad:

04.06.2013 US 201361831128 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.06.2025

73 Titular/es:

CARTESIAN THERAPEUTICS, INC. (100.00%)
704 Quince Orchard Road, Suite 210A
Gaithersburg, MD 20878, US

72 Inventor/es:

MALDONADO, ROBERTO A. y
KISHIMOTO, TAKASHI KEI

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 3 026 667 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

Administración repetida de inmunoterapéuticos específicos de antígeno no inmunosupresores

5 CAMPO DE LA INVENCION

El campo técnico de la invención es la inducción de tolerancia específica de antígeno.

ANTECEDENTES

10 Determinadas enfermedades o afecciones, tales como enfermedades autoinmunitarias, alergias o deficiencias genéticas o adquiridas que requieren terapias de reemplazo de proteínas o enzimas, y enfermedades que requieren terapias biológicas, dan frecuentemente como resultado respuestas inmunitarias no deseadas. Dichas respuestas inmunitarias no deseadas pueden reducirse mediante el uso de fármacos inmunomoduladores. Sin embargo, los
15 fármacos inmunomoduladores convencionales son de amplio espectro. Adicionalmente, a fin de mantener la inmunosupresión, la terapia con fármacos inmunomoduladores es generalmente una propuesta para toda la vida. Desafortunadamente, el uso de inmunomoduladores de amplio espectro está asociado con el riesgo de padecer efectos secundarios graves, tales como tumores, infecciones, nefrotoxicidad y trastornos metabólicos. En consecuencia, serían beneficiosas nuevas terapias inmunomoduladoras.

20 Moghimi (2011); J. Thromb. Haemost. 9(8):1524-1533 divulga la administración de factor VIII y rapamicina. Se enseña que se induce tolerancia para el factor VIII y que (a las dosis utilizadas) la inmunosupresión es leve y transitoria.

25 Zhang (2013); Blood 122(21):2337 divulga nanopartículas con factor VIII y un inmunomodulador, pero este último no se especifica.

El documento WO2008043157 divulga composiciones que comprenden un antígeno y un inmunosupresor en forma de partículas, y el uso de las mismas en la inducción o la estimulación de tolerancia.

30 El documento WO2012054920 divulga una micropartícula tolerogénica para tratar la diabetes.

SUMARIO DE LA INVENCION

35 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Por lo tanto, la invención proporciona una composición inmunoterapéutica específica de antígeno para su uso en la inducción de tolerancia específica de antígeno, en la que la administración repetida de la composición a un sujeto no induce inmunosupresión, y en la que la composición comprende nanovehículos sintéticos poliméricos acoplados a un inhibidor de mTOR, en la que el inhibidor de mTOR es rapamicina o un análogo de rapamicina y en la que (a) la composición comprende además un antígeno exógeno; o (b) la composición se administra concomitantemente con un antígeno exógeno en la misma composición o en
40 composiciones separadas; o (c) la composición no comprende un antígeno exógeno y se administra: (i) antes de la administración de un antígeno exógeno; y/o (ii) después de la administración de un antígeno exógeno; en la que el antígeno es una proteína terapéutica, o un fragmento antigénico de la misma, que no está acoplada al inhibidor de mTOR.

45 Se ha de entender que la invención no se limita a lo que se presenta en los ejemplos a modo de ilustración.

DIVULGACIÓN TÉCNICA DE REFERENCIA

50 La divulgación técnica de referencia que se presenta a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá de la divulgación de la invención en sí y también puede proporcionar antecedentes técnicos para desarrollos técnicos relacionados, tal como se ilustra, entre otros, en los ejemplos de referencia. Por lo tanto, se apreciará que la presente divulgación técnica de referencia no pretende definir la invención como tal, sino más bien situarla en un contexto técnico más amplio.

55 La presente divulgación técnica describe procedimientos que comprenden determinar un protocolo para la administración repetida de un inmunoterapéutico específico de antígeno que no dé lugar a inmunosupresión en un sujeto; y administrar de forma repetida el inmunoterapéutico específico de antígeno a otro sujeto utilizando uno o más elementos del protocolo.

60 En otro aspecto de la presente divulgación técnica se describe un procedimiento que comprende la determinación de un protocolo para la administración repetida de un inmunoterapéutico específico de antígeno que no dé lugar a inmunosupresión en un sujeto, en el que la determinación comprende la administración repetida del inmunoterapéutico específico de antígeno a un sujeto.

65 En otro aspecto de la presente divulgación técnica se describe un procedimiento que comprende la administración repetida a un sujeto de un inmunoterapéutico específico de antígeno que comprende un antígeno o un

inmunomodulador, en el que el antígeno o inmunomodulador se administra de forma repetida según uno o más elementos de un protocolo que no induce inmunosupresión tras la administración repetida del antígeno o un inmunomodulador.

5 En un aspecto de la presente divulgación técnica, el procedimiento comprende, además, obtener o proporcionar un inmunoterapéutico específico de antígeno. En otro aspecto de la presente divulgación técnica, la determinación comprende, además, demostrar que uno o más elementos del protocolo dan como resultado una tolerancia específica de antígeno en el sujeto.

10 En otro aspecto de la presente divulgación técnica, se describe una composición que comprende un inmunoterapéutico específico de antígeno que comprende un antígeno exógeno o un inmunomodulador exógeno en una cantidad que se ha demostrado previamente en un protocolo que no induce inmunosupresión tras la administración repetida. En un aspecto de la presente divulgación técnica, la composición es un kit.

15 En un aspecto de la presente divulgación técnica, el inmunoterapéutico específico de antígeno es uno cualquiera de los inmunoterapéuticos específicos de antígeno que se describen en el presente documento.

En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el protocolo es uno que se ha demostrado previamente que no induce inmunosupresión.

20 En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el antígeno o inmunomodulador está presente en una cantidad que se ha mostrado adicionalmente que da como resultado tolerancia específica de antígeno.

25 En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el inmunoterapéutico específico de antígeno comprende un inmunomodulador exógeno. En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el inmunomodulador exógeno comprende una estatina; un inhibidor de mTOR; un agente de señalización de TGF- β ; un agonista del receptor de TGF- β ; un inhibidor de histona desacetilasa; un corticosteroide; un inhibidor de la función mitocondrial; un inhibidor de P38; un inhibidor de NF- κ B; un ligando del receptor de lectina; un agonista del receptor de adenosina; un agonista de prostaglandina E2; un inhibidor de fosfodiesterasa; un inhibidor del proteasoma; un inhibidor de quinasa; un agonista del receptor acoplado a proteína G; un antagonista del receptor acoplado a proteína G; un glucocorticoide; un retinoide; un inhibidor de citoquinas; un inhibidor del receptor de citoquinas; un activador del receptor de citoquinas; un antagonista del receptor activado por el proliferador de peroxisomas; un agonista del receptor activado por el proliferador de peroxisomas; un inhibidor de histona desacetilasa; un inhibidor de calcineurina; un inhibidor de fosfatasa; un ATP oxidado; IDO; vitamina D3; ciclosporina A; un inhibidor del receptor de hidrocarburo de arilo; resveratrol; azatiopurina; 6-mercaptopurina; aspirina; ácido niflúmico; estriol; tripolida; interleuquina; ciclosporina A o un ARNpi dirigido a citoquinas o receptores de citoquinas. En otro caso, el inmunomodulador exógeno comprende rapamicina, ácido micofenólico o un ligando CD22.

40 En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el inmunoterapéutico específico de antígeno comprende un antígeno exógeno.

En otro aspecto de la presente divulgación técnica, cuando el inmunoterapéutico específico de antígeno comprende también un inmunomodulador exógeno, el antígeno exógeno y el inmunomodulador exógeno no están acoplados el uno al otro. En otro aspecto de la presente divulgación técnica, la administración repetida comprende la administración repetida concomitante del antígeno exógeno y el inmunomodulador exógeno.

50 En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el antígeno exógeno comprende una proteína terapéutica, un antígeno modificado o un antígeno expresado. En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el antígeno expresado se expresa a partir de ARN mensajero modificado.

En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el inmunoterapéutico específico de antígeno da lugar a tolerancia específica de antígeno a un antígeno endógeno.

55 En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el antígeno endógeno comprende un autoantígeno.

En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el autoantígeno comprende los encontrados en espondilitis anquilosante; pénfigo ampolloso; artritis reumatoide; esclerosis múltiple; diabetes; eczema; enfermedad intestinal inflamatoria; lupus o lupus eritematoso sistémico; esclerosis múltiple; cirrosis biliar primaria; psoriasis; sarcoidosis; esclerosis sistémica; esclerodermia; tiroiditis; enfermedad tiroidea autoinmunitaria, tiroiditis de Hashimoto; tirototoxicosis; alopecia areata; enfermedad de Graves; síndrome de Guillain-Barré; enfermedad celíaca; síndrome de Sjögren; fiebre reumática; gastritis; gastritis atrófica autoinmunitaria; hepatitis autoinmunitaria; insulinitis; ooforitis; orquitis; uveítis; uveítis facogénica; miastenia gravis; mixoedema primario; anemia perniciosa; colangitis esclerosante primaria; anemia emolítica autoinmunitaria; enfermedad de Addison; esclerodermia; síndrome de Goodpasture; nefritis; psoriasis; pénfigo vulgar; penfigoide; oftalmía simpática; púrpura trombocitopénica idiopática; feucopenia idiopática; granulomatosis de Wegener o poli/dermatomiositis.

En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el inmunoterapéutico específico de antígeno comprende un antígeno exógeno y da lugar a tolerancia específica de antígeno cuando se administra en presencia de un inmunomodulador endógeno.

5 En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el inmunomodulador endógeno comprende una sustancia y/o una combinación de sustancias involucradas en la apoptosis o la señalización relacionada, una sustancia y/o una combinación de sustancias involucradas en la biología de células T o B, o una sustancia y/o una combinación de sustancias involucradas en la biología de células dendríticas.

10 En otro aspecto de la presente divulgación técnica, la administración repetida se produce de 1 semana a 10 años después de una dosis inicial o una administración repetida previa del inmunoterapéutico específico de antígeno. En otra forma de realización de uno cualquiera de los procedimientos o las composiciones descritos en el presente documento, la administración repetida se produce 1 semana después de una dosis inicial o una administración repetida previa del inmunoterapéutico específico de antígeno. En otro aspecto de la presente divulgación técnica, la

15 administración repetida se produce 2 semanas después de una dosis inicial o una administración repetida previa del inmunoterapéutico específico de antígeno. En otro aspecto de la presente divulgación técnica, la administración repetida se produce de 1 a 12 meses después de una dosis inicial o una administración repetida previa del inmunoterapéutico específico de antígeno.

20 En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el inmunoterapéutico específico de antígeno comprende un antígeno exógeno y un inmunomodulador exógeno, administrándose de forma repetida el antígeno exógeno por una vía diferente a la del inmunomodulador exógeno. En otro aspecto de la presente divulgación técnica, la administración repetida comprende la administración repetida concomitante.

25 En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el antígeno inmunoterapéutico específico de antígeno comprende más de un antígeno exógeno.

En otro aspecto de la presente divulgación técnica, cuando el inmunoterapéutico específico de antígeno comprende un antígeno exógeno y un inmunomodulador exógeno, el antígeno exógeno se administra de forma repetida por una
30 vía diferente a la del inmunomodulador exógeno. En otro aspecto de la presente divulgación técnica, la administración repetida comprende la administración repetida concomitante.

En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el antígeno exógeno y el inmunomodulador exógeno están acoplados el uno al otro. En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el inmunomodulador exógeno comprende
35 el péptido ERY1.

En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el inmunoterapéutico específico de antígeno se administra de forma repetida a otro sujeto utilizando todos o sustancialmente todos los elementos del protocolo.

40 En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el inmunoterapéutico específico de antígeno comprende nanovehículos sintéticos poliméricos acoplados a un inmunomodulador exógeno.

En otro aspecto de la presente divulgación técnica, una carga de inmunomodulador unida a los nanovehículos sintéticos poliméricos, en promedio en los nanovehículos sintéticos poliméricos, se encuentra entre el 0,1% y el 50%
45 (peso/peso). En otro aspecto de la presente divulgación técnica, la carga se encuentra entre el 0,1% y el 20% (peso/peso).

En otro aspecto de la presente divulgación técnica, la carga de inmunomodulador del inmunomodulador exógeno es en promedio de al menos el 95%, 97%, 98% o 99% (peso/peso).
50

En otro aspecto de la presente divulgación técnica, cuando el inmunoterapéutico específico de antígeno comprende un inmunomodulador exógeno y un antígeno exógeno, los nanovehículos sintéticos poliméricos se acoplan adicionalmente al antígeno exógeno. En otro aspecto de la presente divulgación técnica, cuando el inmunoterapéutico específico de antígeno comprende un inmunomodulador exógeno y un antígeno exógeno, el nanovehículo sintético
55 polimérico se administra concomitantemente con un antígeno exógeno.

En otro aspecto de la presente divulgación técnica, se divulga un procedimiento de fabricación de uno cualquiera de los inmunoterapéuticos específicos de antígeno que se describen en el presente documento. En un aspecto de la presente divulgación técnica, el procedimiento comprende producir u obtener un antígeno exógeno o un
60 inmunomodulador exógeno en una cantidad que no induzca inmunosupresión tras la administración repetida. En otro aspecto de la presente divulgación técnica, la cantidad es una cantidad que se ha demostrado previamente en un protocolo que no induce inmunosupresión tras la administración repetida. En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el procedimiento comprende, además, determinar la cantidad o el protocolo.

En otro aspecto de la presente divulgación técnica, se describe un inmunoterapéutico específico de antígeno que comprende un inmunomodulador exógeno o un antígeno exógeno para la fabricación de un medicamento para lograr tolerancia específica de antígeno, pero no la inducción de inmunosupresión, en un sujeto.

En otro aspecto de la presente divulgación técnica, se describe un inmunoterapéutico específico de antígeno que comprende un inmunomodulador exógeno o un antígeno exógeno para lograr tolerancia específica de antígeno, pero no la inducción de inmunosupresión, en un sujeto. En un aspecto de la presente divulgación técnica, el inmunoterapéutico específico de antígeno es para su uso en uno cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

En otro aspecto de la presente divulgación técnica, el inmunoterapéutico específico de antígeno es uno cualquiera de los inmunoterapéuticos específicos de antígeno que se describen en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra los resultados de la administración repetida de un inmunoterapéutico específico de antígeno que comprende un antígeno y rapamicina.

La figura 2 muestra los resultados de la administración repetida de un inmunoterapéutico específico de antígeno que comprende metotrexato, un inmunomodulador exógeno.

La figura 3 muestra los resultados de la administración repetida de un inmunoterapéutico específico de antígeno que comprende metotrexato, un inmunomodulador exógeno.

La figura 4 demuestra la deleción o anergia de células T CD8+ con un antígeno exógeno (OVA) unido a un inmunomodulador exógeno (péptido ERY1).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La divulgación técnica de referencia que se presenta a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá de la divulgación de la invención en sí y también puede proporcionar antecedentes técnicos para desarrollos técnicos relacionados, tal como se ilustra, entre otros, en los ejemplos de referencia. Por lo tanto, se apreciará que la presente divulgación técnica de referencia no pretende definir la invención como tal, sino más bien situarla en un contexto técnico más amplio.

Tal como se utilizan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "un polímero" incluye una mezcla de dos o más de dichas moléculas o una mezcla de diferentes pesos moleculares de una única especie de polímero, la referencia a "un nanovehículo sintético" incluye una mezcla de dos o más de dichos nanovehículos sintéticos o una pluralidad de dichos nanovehículos sintéticos, la referencia a "una molécula de ADN" incluye una mezcla de dos o más de dichas moléculas de ADN o una pluralidad de dichas moléculas de ADN, la referencia a "un inmunomodulador" incluye una mezcla de dos o más de dichos materiales o una pluralidad de moléculas de inmunomodulador.

Tal como se utilizan en el presente documento, el término "comprender" o variaciones del mismo tales como "comprende" o "que comprende" deben leerse de modo que indiquen la inclusión de cualquier objeto (por ejemplo, un aspecto, elemento, característica, propiedad, limitación o etapa del procedimiento/proceso) o grupo de objetos (por ejemplo, aspectos, elementos, características, propiedades, limitaciones o etapas del procedimiento/proceso) mencionado pero no la exclusión de ningún otro objeto o grupo de objetos. Por lo tanto, tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "que comprende" es inclusiva, y no excluye objetos o etapas del procedimiento/proceso adicionales que no se hayan mencionados.

En cualquiera de las composiciones y procedimientos proporcionados en el presente documento, "que comprende" se puede reemplazar por "que consiste esencialmente en" o "que consiste en". La expresión "que consiste esencialmente en" se utiliza en el presente documento de modo que requiera el o los objetos o etapas especificados, así como aquellos que no afectan materialmente al carácter o la función de la invención reivindicada. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "que consiste" se utiliza para indicar la presencia del objeto (por ejemplo, un aspecto, elemento, característica, propiedad, limitación o etapa del procedimiento/proceso) o grupo de objetos (por ejemplo, aspectos, elementos, características, propiedades, limitaciones o etapas del procedimiento/proceso) mencionado.

A. INTRODUCCIÓN

Tal como se ha mencionado anteriormente, las composiciones inmunomoduladoras convencionales actuales son de amplio espectro y generalmente dan lugar a una regulación sistémica general a la baja del sistema inmunitario. Las composiciones y los procedimientos descritos en el presente documento permiten efectos inmunitarios más

específicos, particularmente cuando los inmunoterapéuticos específicos de antígeno mencionados se utilizan en una administración repetida. Una inmunosupresión amplia durante la administración repetida es particularmente preocupante, ya que generalmente daría como resultado una inmunosupresión a largo plazo que podría dar lugar a eventos adversos significativos para los sujetos que reciben las composiciones inmunomoduladoras convencionales administradas de forma repetida. En cambio, los inventores han descubierto que es posible proporcionar composiciones inmunomoduladoras específicas de antígeno y procedimientos que no den lugar a una inmunosupresión amplia o a largo plazo durante la administración repetida.

Los inventores han descubierto, de forma inesperada y sorprendente, que los problemas y las limitaciones indicadas anteriormente pueden superarse llevando a la práctica la invención divulgada en el presente documento. En particular, los inventores han descubierto, inesperadamente, que es posible proporcionar procedimientos que comprenden determinar un protocolo para administrar de forma repetida un inmunoterapéutico específico de antígeno que no dé como resultado inmunosupresión en un sujeto; y administrar de forma repetida el inmunoterapéutico específico de antígeno a otro sujeto utilizando uno o más elementos del protocolo. Adicionalmente, los inventores han descubierto, inesperadamente, que es posible proporcionar procedimientos que comprenden: administrar de forma repetida a un sujeto un inmunoterapéutico específico de antígeno que comprende un antígeno o un inmunomodulador, en el que el antígeno o inmunomodulador se administra de forma repetida de acuerdo con uno o más elementos de un protocolo que no induce inmunosupresión tras la administración repetida del antígeno o inmunomodulador. En algunas formas de realización, el protocolo es uno que se ha demostrado previamente que no induce inmunosupresión en un sujeto. Además, los inventores han descubierto, inesperadamente, que es posible proporcionar composiciones que comprenden: un inmunoterapéutico específico de antígeno que comprende un antígeno exógeno o un inmunomodulador exógeno en una cantidad que no induce inmunosupresión cuando se administra de forma repetida. En algunas formas de realización, la cantidad es una que se ha demostrado previamente en un protocolo que no induce inmunosupresión tras la administración repetida en un sujeto.

B. DEFINICIONES

"Administrar" o "administración" o "administra" significa proporcionar un material a un sujeto de una manera que sea farmacológicamente útil. Se pretende que el término incluya en algunos casos hacer que se administre. "Hacer que se administre" significa incitar, instar, alentar, ayudar, inducir o dirigir, de forma directa o indirecta, a otra persona para que administre el material.

"Una cantidad que se ha demostrado previamente en un protocolo que no induce inmunosupresión tras la administración repetida" en el contexto de una composición, forma de dosificación, o procedimiento para la administración a un sujeto se refiere a una cantidad del antígeno o inmunomodulador que no induce inmunosupresión tras la administración repetida cuando se administra de acuerdo con un protocolo que se ha demostrado previamente que no induce inmunosupresión.

Las cantidades eficaces dependerán, por supuesto, del sujeto particular que se esté tratando; de la gravedad de una afección, enfermedad o trastorno; de los parámetros individuales del paciente, que incluyen la edad, el estado físico, el tamaño y el peso; de la duración del tratamiento; de la naturaleza de la terapia concurrente (si la hubiera); de la vía de administración específica y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del profesional sanitario. Estos factores son bien conocidos por los expertos en la técnica, y se pueden abordar con solo una experimentación rutinaria. En general, se prefiere usar una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta según un criterio médico razonable. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que un paciente puede insistir en una dosis más baja o una dosis tolerable por razones médicas, psicológicas, o virtualmente por cualquier otra razón.

En determinados casos, las dosis o las cantidades de los inmunomoduladores y/o antígenos en las composiciones pueden variar de aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 100.000 µg/kg. En algunos casos, las dosis pueden variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg. En otros casos más, las dosis pueden variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 75 mg/kg o de aproximadamente 75 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg. Alternativamente, la dosis o cantidad se puede administrar basándose en el número de nanovehículos sintéticos que proporcionan la cantidad deseada de inmunomoduladores y/o antígenos. Por ejemplo, las dosis o cantidades útiles incluyen más de 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} nanovehículos sintéticos (por dosis). Otros ejemplos de dosis o cantidades útiles incluyen de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{10} , de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^9 o de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^9 nanovehículos sintéticos (por dosis).

"Antígeno" significa un antígeno de célula B o antígeno de célula T. "Tipo(s) de antígenos" significa moléculas que comparten las mismas, o sustancialmente las mismas, características antigénicas. En algunos casos, los antígenos pueden ser proteínas, polipéptidos, péptidos, lipoproteínas, glicolípidos, polinucleótidos, polisacáridos, o están contenidos o se expresan en células. En algunos casos, tales como cuando los antígenos no están bien definidos o caracterizados, los antígenos pueden estar contenidos dentro de una preparación celular o tisular, restos celulares, exosomas celulares, medios acondicionados, etc. En algunos casos, el antígeno puede ser endógeno o exógeno. El antígeno endógeno comprende un antígeno que se genera por el propio organismo de un sujeto y puede dar como

resultado respuestas inmunitarias que pueden dar lugar a una tolerancia específica de antígeno con un inmunoterapéutico específico de antígeno, tal como uno que comprende un inmunomodulador exógeno, tras la administración repetida tal como se describe en el presente documento. En algunos casos, el antígeno endógeno da como resultado una tolerancia específica de antígeno con la administración repetida de un inmunomodulador exógeno tal como se describe en el presente documento. Los ejemplos de antígeno endógeno comprenden antígenos autoinmunitarios, algunos de los cuales se divulgan en otra parte del presente documento. El antígeno exógeno comprende un antígeno que se administra como parte del inmunoterapéutico específico de antígeno o como parte de alguna otra intervención terapéutica, pero que no está generado por el propio organismo del sujeto. Los ejemplos de antígenos exógenos comprenden alérgenos ambientales, proteínas o polipéptidos terapéuticos, etc., algunos de los cuales se divulgan en otra parte del presente documento.

"Específico de antígeno" se refiere a cualquier respuesta inmunitaria que se produce como consecuencia de la presencia del antígeno, o parte del mismo, o que genera moléculas que reconocen o se unen específicamente al antígeno. Por ejemplo, cuando la respuesta inmunitaria es la producción de anticuerpos específicos de antígeno, se producen anticuerpos que se unen específicamente al antígeno. Como otro ejemplo, cuando la respuesta inmunitaria es la proliferación y/o actividad de células B o células T CD4+ o células T CD8+ específicas de antígeno, la proliferación y/o la actividad se debe al reconocimiento del antígeno, o parte del mismo, solo o formando un complejo con moléculas MHC, células B, etc.

"Inmunoterapéutico específico de antígeno" significa un agente terapéutico que es capaz de tener un efecto tolerogénico sobre la respuesta inmunitaria de un sujeto a un antígeno de interés. Un inmunoterapéutico específico de antígeno puede comprender un antígeno o un inmunomodulador. En determinados casos, los inmunoterapéuticos específicos de antígeno pueden comprender tanto un antígeno como un inmunomodulador, en los que el antígeno está acoplado o desacoplado al inmunomodulador. En determinados casos, los inmunoterapéuticos específicos de antígeno pueden comprender un antígeno y un inmunomodulador que no están acoplados entre sí y el antígeno y el inmunomodulador se administran de forma repetida concomitantemente. En tales casos, el antígeno y el inmunomodulador pueden administrarse en la misma composición o en forma de composiciones separadas, y es la totalidad de las composiciones que comprenden el antígeno o inmunomodulador lo que constituye el inmunoterapéutico específico de antígeno. En algunos casos, los inmunoterapéuticos específicos de antígeno que comprenden antígenos (es decir, antígenos exógenos) y/o inmunomoduladores (es decir, inmunomoduladores exógenos) pueden interactuar con inmunomoduladores endógenos y/o antígenos endógenos, respectivamente, para preferentemente dar como resultado o dar lugar a respuestas inmunitarias que pueden dar como resultado una tolerancia específica de antígeno.

"Eficacia inmunoterapéutica específica de antígeno" significa que, para un antígeno de interés (Agi), el título de IgG de Agi (indicado como CE50) cambia del nivel del control positivo a un título (indicado como CE50) al menos un 50% inferior, con la misma dosis de Agi. Véase en general. J. R. Crowther, "ELISA: Theory and Practice" (1995 Humana Press).

"Promedio", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la media aritmética a menos que se indique lo contrario.

"Antígeno de células B" significa cualquier antígeno que es reconocido por, y desencadena, una respuesta inmunitaria en, una célula B (por ejemplo, un antígeno que es reconocido específicamente por una célula B o un receptor de la misma). En algunos casos, un antígeno que es un antígeno de células T también es un antígeno de células B. En otros casos, el antígeno de células T no es también un antígeno de células B. Los antígenos de células B incluyen, pero sin limitación, proteínas, péptidos, etc. En algunos casos, el antígeno de células B comprende un antígeno no proteico (es decir, un antígeno que no es una proteína o un péptido).

"Hacer que" significa ocasionar que una acción suceda, ya sea de forma directa o indirecta (por ejemplo, a través de un tercero). En algunos casos, la invención se aplica en procedimientos que comprenden hacer que el inmunoterapéutico específico de antígeno se administre de forma repetida a otro sujeto utilizando uno o más elementos del protocolo.

"Combinación", tal como se aplica a dos o más materiales y/o agentes (a los que también se alude en el presente documento como los *componentes*), se utiliza para definir el material en el que están asociados los dos o más materiales/agentes. Los componentes pueden identificarse por separado, por ejemplo, primer componente, segundo componente, tercer componente, etc. Los términos "combinado" y "combinar" en este contexto deben interpretarse en consecuencia.

La asociación de dos o más materiales/agentes en una combinación puede ser física o no física. Los ejemplos de materiales/agentes combinados con asociación física incluyen:

- composiciones (por ejemplo, formulaciones unitarias) que comprenden dos o más materiales/agentes en mezcla (por ejemplo, dentro de la misma dosis unitaria);

- composiciones que comprenden material en el que los dos o más materiales/agentes están unidos químicamente/fisicoquímicamente (por ejemplo, mediante reticulación, aglomeración molecular o unión a un resto de vehículo común);
- 5 • composiciones que comprenden material en el que los dos o más materiales/agentes están empaquetados conjuntamente químicamente/fisicoquímicamente (por ejemplo, dispuestos sobre, o dentro de, vesículas lipídicas, partículas (por ejemplo, micropartículas o nanopartículas) o gotitas de emulsión);
- 10 • kits farmacéuticos, paquetes farmacéuticos o paquetes para pacientes en los que dos o más materiales/agentes están empaquetados conjuntamente o se presentan conjuntamente (por ejemplo, como parte de una serie de dosis unitarias);

Los ejemplos de materiales/agentes combinados no asociados físicamente incluyen:

- 15 • material (por ejemplo, una formulación no unitaria) que comprende al menos uno de los dos o más materiales/agentes junto con instrucciones para la asociación extemporánea del, al menos un, compuesto/agente para formar una asociación física de los dos o más materiales/agentes;
- 20 • material (por ejemplo, una formulación no unitaria) que comprende al menos uno de los dos o más materiales/agentes junto con instrucciones para la terapia combinada con los dos o más materiales/agentes;
- material que comprende al menos uno de los dos o más materiales/agentes junto con instrucciones para su administración a una población de pacientes en la que se han administrado (o se están administrando) el otro o los otros de los dos o más materiales/agentes;
- 25 • material que comprende al menos uno de los dos o más materiales/agentes en una cantidad o en una forma que está específicamente adaptada para su uso en combinación con el otro o los otros de los dos o más materiales/agentes.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "terapia de combinación" se utiliza para definir terapias que comprenden el uso de una combinación de dos o más materiales/agentes (tal como se define en el presente documento). Por lo tanto, las referencias a "terapia de combinación", "combinaciones" y el uso de materiales/agentes "en combinación" en la presente solicitud pueden referirse a materiales/agentes que se administran como parte del mismo régimen de tratamiento general. Como tal, la posología de cada uno de los dos o más materiales/agentes puede diferir: cada uno puede administrarse al mismo tiempo o en puntos temporales diferentes. Por lo tanto, se apreciará que los materiales/agentes de la combinación se pueden administrar secuencialmente (por ejemplo, antes o después) o simultáneamente, ya sea en la misma formulación farmacéutica (es decir, juntos) o en diferentes formulaciones farmacéuticas (es decir, por separado). Simultáneamente en la misma formulación es en forma de una formulación unitaria mientras que simultáneamente en diferentes formulaciones farmacéuticas no se considera una formulación unitaria. Las posologías de cada uno de los dos o más materiales/agentes en una terapia de combinación también pueden diferir con respecto a la vía de administración.

45 "Concomitantemente" significa la administración de dos o más materiales/agentes a un sujeto de una manera que está correlacionada en el tiempo, de forma preferida lo suficientemente correlacionada en el tiempo como para proporcionar una modulación en una respuesta inmunitaria, y de forma incluso más preferida los dos o más materiales/agentes se administran en combinación. En algunos casos, la administración concomitante puede abarcar la administración de dos o más materiales/agentes dentro de un periodo de tiempo especificado, preferentemente dentro de un periodo de 1 mes, de forma más preferida dentro de un periodo de 1 semana, de forma aún más preferida dentro de un periodo de 1 día, y de forma incluso más preferida dentro de un periodo de 1 hora. En algunos casos, los materiales/agentes pueden administrarse de forma repetida concomitantemente; es decir, se administran concomitantemente en más de una ocasión.

55 "Acoplar", "acoplado" o "acoplados" (y similares) significa asociar químicamente una entidad (por ejemplo, una fracción) con otra. En algunos casos, el acoplamiento es covalente, lo que significa que se produce en el contexto de la presencia de un enlace covalente entre las dos entidades. En casos no covalentes, el acoplamiento no covalente está mediado por interacciones no covalentes, incluidas, pero sin limitación, interacciones de carga, interacciones de afinidad, coordinación de metales, adsorción física, interacciones anfitrión-huésped, interacciones hidrófobas, interacciones de apilamiento π - π , interacciones de enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo y/o combinaciones de las mismas. En algunos casos, la encapsulación es una forma de acoplamiento.

65 "Determinación" o "determinar" o "demostración" o "demostrar" significa constatar una relación fáctica. Estos términos significan establecer una conexión entre una o más entradas, por ejemplo, los elementos de un protocolo o el protocolo completo, y una o más salidas, por ejemplo, la presencia o ausencia de inmunosupresión o la consecución de tolerancia específica de antígeno. En algunos casos, está previsto determinar que uno o más elementos de un

protocolo para la administración repetida de un inmunoterapéutico específico de antígeno no dan lugar a inmunosupresión en un sujeto.

La determinación, etc., puede realizarse de diversas maneras, incluidas, pero sin limitación, la realización de experimentos o la realización de proyecciones. Por ejemplo, uno o más elementos de un protocolo, tal como la dosis de un inmunomodulador, pueden determinarse partiendo de uno o más elementos de un protocolo de ensayo, tal como una dosis de ensayo, y utilizando técnicas de escalado conocidas (tales como el escalado alométrico o isométrico) para determinar el protocolo, tal como la dosis, para su administración. En otro caso, uno o más elementos de un protocolo, tales como la dosis, pueden determinarse sometiendo a ensayo variaciones en los, uno o más, elementos, tales como diversas dosis en un sujeto, por ejemplo, mediante experimentación directa basada en la experiencia y datos orientativos. En algunos casos, "determinación" o "determinar" o "demostración" o "demostrar" comprende "hacer que se determine" o "hacer que se demuestre". "Hacer que se determine" o "hacer que se demuestre" significa incitar, instar, alentar, ayudar, inducir o dirigir o actuar en coordinación con una entidad para que la entidad determine una relación fáctica; incluidas de forma directa o indirecta, o de forma expresa o implícita.

"Forma de dosificación" significa un material farmacológicamente y/o inmunológicamente activo en un medio, vehículo, excipiente o dispositivo adecuado para su administración a un sujeto. Una cualquiera de las composiciones o dosis descritas en el presente documento puede presentarse en una forma de dosificación.

"Encapsular" significa encerrar al menos una porción de una sustancia dentro de un nanovehículo sintético. En algunos casos, una sustancia está completamente encerrada dentro de un nanovehículo sintético. En otros casos, la mayor parte o la totalidad de una sustancia que está encapsulada no está expuesta al entorno local externo al nanovehículo sintético. En otros casos, no más del 50%, 40%, 30%, 20%, 10% o 5% (peso/peso) está expuesto al entorno local. La encapsulación es distinta de la absorción, que dispone la mayor parte o la totalidad de una sustancia en una superficie de un nanovehículo sintético, y deja la sustancia expuesta al entorno local externo al nanovehículo sintético.

"Inmunomodulador" significa un compuesto o una combinación de compuestos que provoca que una APC (célula presentadora de antígeno) tenga un efecto tolerogénico. Un efecto tolerogénico generalmente se refiere a la producción o expresión de citoquinas u otros factores por parte de la APC o cambios en el perfil de expresión genético de las APC (por ejemplo, cambios en la expresión de moléculas co-estimuladoras) que reducen, inhiben o previenen una respuesta inmunitaria específica de antígeno no deseada, o que fomentan una respuesta inmunitaria tolerogénica específica de antígeno deseada. En algunos casos, el inmunomodulador puede ser endógeno o exógeno. Los inmunomoduladores endógenos comprenden inmunomoduladores que se generan por el propio organismo de un sujeto y pueden dar como resultado respuestas inmunitarias que pueden dar lugar a tolerancia específica de antígeno con un inmunoterapéutico específico de antígeno, tal como uno que comprende un antígeno exógeno, tras la administración repetida tal como se describe en el presente documento. En algunos casos, el inmunomodulador endógeno puede dar lugar a una tolerancia específica de antígeno cuando se administra un antígeno exógeno tal como se describe en el presente documento. Los ejemplos de inmunomoduladores endógenos comprenden células apoptóticas y otros ligandos o marcadores apoptóticos, citoquinas tolerogénicas, tales como IL-10, y marcadores de la superficie celular implicados en respuestas tolerogénicas, tales como CD22. Los inmunomoduladores exógenos comprenden inmunomoduladores que se administran como parte del inmunoterapéutico específico de antígeno o como parte de alguna otra intervención terapéutica, pero que no se generan por el propio organismo del sujeto. Los ejemplos de inmunomoduladores exógenos comprenden rapamicina y otros inmunomoduladores divulgados en el presente documento.

En un caso, el inmunomodulador es uno que hace que una APC fomente un fenotipo regulador en una o más células inmunitarias efectoras. Por ejemplo, el fenotipo regulador puede caracterizarse por la inhibición de la producción, inducción, estimulación o reclutamiento de células T CD4+ o células B específicas de antígeno, la inhibición de la producción de anticuerpos específicos de antígeno, la producción, inducción, estimulación o el reclutamiento de células Treg (por ejemplo, células Treg CD4+CD25highFoxP3+), etc. Esto puede ser el resultado de la conversión de células T CD4+ o células B en un fenotipo regulador. Esto también puede ser el resultado de la inducción de FoxP3 en otras células inmunitarias, tales como células T CD8+, macrófagos y células iNKT. En un caso, el inmunomodulador es uno que afecta a la respuesta de la APC después de procesar un antígeno. En otro caso, el inmunomodulador no es uno que interfiera con el procesamiento del antígeno. En un caso adicional, el inmunomodulador no es una molécula de señalización apoptótica. En otro caso, el inmunomodulador no es un fosfolípido.

Los inmunomoduladores incluyen, pero sin limitación, estatinas; inhibidores de mTOR, tales como rapamicina o un análogo de rapamicina; agentes de señalización de TGF- β ; agonistas del receptor de TGF- β ; inhibidores de histona desacetilasa, tales como Tricostatina A; corticosteroides; inhibidores de la función mitocondrial, tales como rotenona; inhibidores de P38; inhibidores de NF- κ B, tales como 6Bio, Dexametasona, TCPA-1, IKK VII; agonistas del receptor de adenosina; agonistas de prostaglandina E2 (PGE2), tales como Misoprostol; inhibidores de fosfodiesterasa, tales como el inhibidor de fosfodiesterasa 4 (PDE4), tales como Rolipram; inhibidores del proteasoma; inhibidores de quinasas; agonistas del receptor acoplado a proteína G; antagonistas del receptor acoplado a proteína G; glucocorticoides; retinoides; inhibidores de citoquinas; inhibidores del receptor de citoquinas; activadores del receptor de citoquinas; antagonistas de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas; agonistas del receptor activado por el proliferador de peroxisomas; inhibidores de histona desacetilasa; inhibidores de calcineurina;

inhibidores de fosfatasa; inhibidores de PI3KB, tales como TGX-221; inhibidores de la autofagia, tales como 3-metiladenina; inhibidores del receptor de hidrocarburos de arilo; inhibidor de proteasoma I (PSI); y ATP oxidados, tales como bloqueadores del receptor P2X. Los inmunomoduladores también incluyenIDO, vitamina D3, ciclosporinas, tales como ciclosporina A, inhibidores del receptor de hidrocarburos de arilo, resveratrol, azatiopurina (Aza), 6-mercaptapurina (6-MP), 6-tioguanina (6-TG), FK506, sangliferina A, salmeterol, micofenolato de mofetilo (MMF), aspirina y otros inhibidores de COX, ácido niflúmico, estriol y triptolida. En algunos casos, el inmunomodulador puede comprender uno cualquiera de los agentes descritos en el presente documento.

El inmunomodulador puede ser un compuesto que ejerce el efecto tolerogénico directamente sobre las CPA o puede ser un compuesto que ejerce el efecto tolerogénico indirectamente (es decir, después de haberse procesado de alguna forma tras su administración). Por lo tanto, los inmunomoduladores incluyen formas de profármaco de cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento.

Los inmunomoduladores también incluyen ácidos nucleicos que codifican los péptidos, polipéptidos o proteínas descritos en el presente documento que dan lugar a una respuesta inmunitaria tolerogénica. En algunos casos, por lo tanto, el inmunomodulador es un ácido nucleico que codifica un péptido, polipéptido o proteína que da como resultado una respuesta inmunitaria tolerogénica, y es el ácido nucleico el que se acopla al nanovehículo sintético.

El ácido nucleico puede ser ADN o ARN, tal como ARNm. En algunos casos, las composiciones comprenden un complemento, tal como un complemento de longitud completa, o una forma degenerada (debido a la degeneración del código genético) de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento. En algunos casos, el ácido nucleico es un vector de expresión que se puede transcribir cuando se transfecta a una línea celular. En algunos casos, el vector de expresión puede comprender un plásmido, entre otros. Los ácidos nucleicos se pueden aislar o sintetizar utilizando enfoques de biología molecular estándar, por ejemplo, utilizando una reacción en cadena de la polimerasa para producir un fragmento de ácido nucleico, que después se purifica y se clona en un vector de expresión. Se pueden encontrar técnicas adicionales útiles en la puesta en práctica de la presente invención en Current Protocols in Molecular Biology 2007 por John Wiley and Sons, Inc.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual (tercera edición) Joseph Sambrook, Peter MacCallum Cancer Institute, Melbourne, Australia; David Russell, centro médico University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Cold Spring Harbor.

En algunos casos, los inmunomoduladores descritos en el presente documento están acoplados a nanovehículos sintéticos. En casos preferidos, el inmunomodulador es un elemento adicional al material que forma la estructura del nanovehículo sintético. Por ejemplo, en un caso en el que el nanovehículo sintético está compuesto por uno o más polímeros, el inmunomodulador es un compuesto adicional y acoplado a uno o más polímeros. Como otro ejemplo, en un caso en el que el nanovehículo sintético está formado por uno o más lípidos, el inmunomodulador es de nuevo adicional y está acoplado a los, uno o más, lípidos. En algunos casos, como cuando el material del nanovehículo sintético también da como resultado un efecto tolerogénico, el inmunomodulador es un elemento presente adicionalmente al material del nanovehículo sintético que da como resultado un efecto tolerogénico.

Otros inmunomoduladores ilustrativos incluyen, pero sin limitación, fármacos de moléculas pequeñas, productos naturales, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos contra CD20, CD3, CD4), fármacos basados en agentes biológicos, fármacos basados en hidratos de carbono, nanopartículas, liposomas, ARNi, ácidos nucleicos antisentido, aptámeros, metotrexato, NSAID; fingolimod; natalizumab; alemtuzumab; anti-CD3; tacrolimus (FK506), etc. Los expertos en la técnica conocen inmunomoduladores adicionales.

En algunos de los procedimientos o las composiciones descritos en el presente documento, el inmunomodulador se encuentra en una forma, tal como una forma nanocristalina, en el que la forma del propio inmunomodulador es una partícula o similar a una partícula. En algunos casos, estas formas imitan un virus u otro patógeno extraño. Se han nanonizado muchos fármacos y los expertos en la técnica conocerán procedimientos apropiados para producir formas farmacológicas de este tipo. Los nanocristales de fármacos, tales como rapamicina nanocristalina, son conocidos por los expertos en la técnica (Katteboinaa, et al. 2009, International Journal of PharmTech Resesarch; Vol. 1, N° 3; páginas 682-694. Tal como se utiliza en el presente documento, un "nanocristal de fármaco" se refiere a una forma de un fármaco (por ejemplo, un inmunomodulador) que no incluye un vehículo o material de matriz. En algunos casos, los nanocristales de fármacos comprenden el 90%, 95%, 98% o 99% o más de fármaco. Los procedimientos para producir los nanocristales de fármacos incluyen, sin limitación, molienda, homogeneización a alta presión, precipitación, secado por pulverización, expansión rápida de la solución supercrítica (RESS), tecnología Nanoedge® (Baxter Healthcare) y Nanocrystal Technology™ (Elan Corporation). En algunos casos, se puede utilizar un tensioactivo o un estabilizador para la estabilidad estática o electrostática del nanocristal de fármaco. En algunos casos, el nanocristal o la forma nanocristalina de un inmunomodulador puede utilizarse para aumentar la solubilidad, la estabilidad y/o la biodisponibilidad del inmunomodulador, en particular inmunomoduladores que son insolubles o lábiles.

"Inmunosupresión" significa (1) regulación a la baja no duradera, estadísticamente significativa, de una respuesta inmunitaria como resultado de la administración repetida de un inmunoterapéutico específico de antígeno, o (2) la respuesta de un sujeto de ensayo no humano a un ensayo ELISA de respuesta de anticuerpos dependiente de células T con provocación con KLH, asumiendo que KLH no es el antígeno de interés, después de al menos una administración repetida de un inmunoterapéutico específico de antígeno, en el que la respuesta se caracteriza por que el título de IgG

de KLH (indicado como CE50) cambia de nivel de control positivo a un título (indicado como CE50) equivalente o inferior a 3 desviaciones estándar por encima del control negativo medio ("fondo"), con la misma dosis de KLH. Véase en general. J. R. Crowther, "ELISA: Theory and Practice" (1995 Humana Press). En un caso preferido, la regulación a la baja no duradera y estadísticamente significativa significa que la regulación a la baja (el brazo de tratamiento medido frente al brazo sin tratamiento) no evidencia una diferencia estadísticamente significativa durante más de una semana después de la última administración repetida del inmunoterapéutico específico de antígeno. Diversas composiciones, procedimientos, protocolos y formas de dosificación no dan como resultado, o no inducen, inmunosupresión.

En la literatura se describen, en general, ensayos ELISA de provocación con KLH, por ejemplo por J.T. Brisbin et al., Influence of In-Feed Virginiamycin on the Systemic and Mucosal Antibody Response of Chickens, Poultry Science 87:1995-1999 (2008); o pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo de Stellar Biotechnologies (332 East Scott Street, Port Hueneme, California 93041, Estados Unidos) como el artículo kit ELISA de IgG anti-KLH de ratón ELI-01G, o kit ELISA de IgG anti-KLH NHP ELI-03G.

Un procedimiento ELISA para la medición de una concentración de anticuerpo anti-KLH, por ejemplo, un ELISA en sándwich típico, puede consistir en las etapas siguientes (i) preparar un material de recubrimiento de placas de ELISA de tal manera que el anticuerpo diana de interés se acople a un polímero de sustrato u otro material adecuado (ii) preparar el material de recubrimiento en una solución acuosa (tal como PBS) y suministrar la solución de material de recubrimiento a los pocillos de una placa de múltiples pocillos para la deposición durante la noche del recubrimiento sobre la placa de múltiples pocillos (iii) lavar a fondo la placa de múltiples pocillos con tampón de lavado (tal como Tween-20 al 0,05% en PBS) para eliminar el exceso de material de recubrimiento (iv) bloquear la placa para una unión no específica mediante la aplicación de una solución de diluyente (tal como suero bovino fetal al 10% en PBS), (v) lavar la solución de bloqueo/diluyente de la placa con tampón de lavado (vi) diluir la o las muestras de suero que contienen anticuerpos y patrones apropiados (controles positivos) con diluyente según sea necesario para obtener una concentración que sature adecuadamente la respuesta de ELISA (vii) diluir en serie las muestras de plasma en la placa de múltiples pocillos para abarcar un intervalo de concentraciones adecuadas para generar una curva de respuesta de ELISA (viii) incubar la placa para proporcionar la unión anticuerpo-diana (ix) lavar la placa con tampón de lavado para eliminar los anticuerpos no unidos al antígeno (x) añadir una concentración adecuada de un anticuerpo de detección secundario en el mismo diluyente, tal como un anticuerpo de detección acoplado a biotina capaz de unirse al anticuerpo primario (xi) incubar la placa con el anticuerpo de detección aplicado, seguido de lavado con tampón de lavado (xii) añadir una enzima tal como estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano picante) que se unirá a la biotina que se encuentra en los anticuerpos biotinilados e incubar (xiii) lavar la placa de múltiples pocillos (xiv) añadir uno o más sustratos (tales como solución de TMB) a la placa (xv) aplicar una solución de detención (tal como ácido sulfúrico 2 N) cuando se haya completado el desarrollo del color (xvi) leer la densidad óptica de los pocillos de la placa a una longitud de onda específica para el sustrato (450 nm con la sustracción de lecturas a 570 nm) (xvi) aplicar una curva multiparamétrica adecuada que se ajuste a los datos y definir la concentración eficaz semimáxima (CE50) como la concentración en la curva en la que se alcanza la mitad del valor de DO máximo para los patrones de la placa.

"Carga" es la cantidad de inmunomodulador de una composición inmunomoduladora exógena (peso/peso). Por ejemplo, cuando se une a un nanovehículo sintético, la carga se basa en el peso total de la formulación seca de los materiales en un nanovehículo sintético completo (peso/peso). Generalmente, dicha carga se calcula como un promedio en una población de nanovehículos sintéticos. En un caso, la carga promedio de todos los nanovehículos sintéticos se encuentra entre el 0,1% y el 99%. En otro caso, la carga se encuentra entre el 0,1% y el 50%. En otro caso, la carga del inmunomodulador se encuentra entre el 0,1% y el 20%. En otro caso, la carga del inmunomodulador no supera el 25% en promedio en una población de nanovehículos sintéticos. En algunos casos, la carga se calcula tal como puede describirse en los Ejemplos o tal como se conoce en la técnica.

Como otros ejemplos, cuando la forma del inmunomodulador es en sí una partícula o similar a una partícula, tal como un inmunomodulador nanocristalino, la carga de inmunomodulador es la cantidad del inmunomodulador en las partículas o similares (peso/peso). En tales casos, la carga puede acercarse al 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más.

"Dimensión máxima de un nanovehículo sintético" significa la dimensión mayor de un nanovehículo medida a lo largo de cualquier eje del nanovehículo sintético. "Dimensión mínima de un nanovehículo sintético" significa la dimensión más pequeña de un nanovehículo sintético medida a lo largo de cualquier eje del nanovehículo sintético. Por ejemplo, para un nanovehículo sintético esférico, la dimensión máxima y mínima de un nanovehículo sintético sería sustancialmente idéntica, y sería el tamaño de su diámetro. De manera similar, para un nanovehículo sintético cuboidal, la dimensión mínima de un nanovehículo sintético sería la más pequeña de su altura, anchura o longitud, mientras que la dimensión máxima de un nanovehículo sintético sería la mayor de su altura, anchura o longitud. En un caso, la dimensión mínima de al menos el 75%, preferentemente al menos el 80%, de forma más preferida al menos el 90% de los nanovehículos sintéticos presentes en una muestra, con respecto al número total de nanovehículos sintéticos presentes en la muestra, es igual o superior a 100 nm. En un caso, la dimensión máxima de al menos el 75%, preferentemente al menos el 80%, de forma más preferida al menos el 90% de los nanovehículos sintéticos presentes en una muestra, con respecto al número total de nanovehículos sintéticos presentes en la muestra, es igual o inferior a 5 µm. Preferentemente, la dimensión mínima de al menos el 75%, preferentemente al menos el 80%, de forma más preferida al menos el 90% de los nanovehículos sintéticos presentes en una muestra, con respecto al número total de nanovehículos sintéticos presentes en la muestra, es superior a 110 nm, de forma más preferida

superior a 120 nm, de forma más preferida superior a 130 nm, y de forma aún más preferida superior a 150 nm. La relación de aspectos de las dimensiones máxima y mínima de los nanovehículos sintéticos puede variar. Por ejemplo, la relación de aspecto de las dimensiones máxima y mínima de los nanovehículos sintéticos puede variar de 1:1 a 1.000.000:1, preferentemente de 1:1 a 100.000:1, de forma más preferida de 1:1 a 10.000:1, de forma más preferida de 1:1 a 1000:1, de forma aún más preferida de 1:1 a 100:1, y de forma todavía más preferida de 1:1 a 10:1. Preferentemente, una dimensión máxima de al menos el 75%, preferentemente al menos el 80%, de forma más preferida al menos el 90% de los nanovehículos sintéticos presentes en una muestra, con respecto al número total de nanovehículos sintéticos presentes en la muestra, es igual o inferior a 3 μm , de forma más preferida igual o inferior a 2 μm , de forma más preferida igual o inferior a 1 μm , de forma más preferida igual o inferior a 800 nm, de forma más preferida igual o inferior a 600 nm, y de forma todavía más preferida igual o inferior a 500 nm. En casos preferidos, una dimensión mínima de al menos el 75%, preferentemente al menos el 80%, de forma más preferida al menos el 90% de los nanovehículos sintéticos presentes en una muestra, con respecto al número total de nanovehículos sintéticos presentes en la muestra, es igual o superior a 100 nm, de forma más preferida igual o superior a 120 nm, de forma más preferida igual o superior a 130 nm, de forma más preferida igual o superior a 140 nm, y de forma todavía más preferida igual o superior a 150 nm. La medición de las dimensiones de los nanovehículos sintéticos (por ejemplo, el diámetro eficaz) se puede obtener suspendiendo los nanovehículos sintéticos en un medio líquido (normalmente acuoso) y usando dispersión dinámica de luz (DLS) (por ejemplo, usando un instrumento Brookhaven ZetaPALS). Por ejemplo, una suspensión de nanovehículos sintéticos se puede diluir desde un tampón acuoso en agua purificada para lograr una concentración final de suspensión de nanovehículos sintéticos de aproximadamente 0,01 a 0,1 mg/ml. La suspensión diluida se puede preparar directamente en el interior de, o transferirla a, una cubeta adecuada para el análisis por DLS. La cubeta se puede disponer en el aparato de DLS, dejar que se equilibre a la temperatura controlada, y después realizar un barrido durante el tiempo suficiente para adquirir una distribución estable y reproducible basada en las entradas adecuadas para la viscosidad del medio y los índices de refracción de la muestra. Después se registra el diámetro eficaz, o la media de la distribución. La determinación de los tamaños eficaces de nanovehículos sintéticos de alta relación de aspecto, o no esferoidales, puede requerir técnicas de aumento, tales como microscopía electrónica, para obtener mediciones más precisas. "Dimensión" o "tamaño" o "diámetro" de nanovehículos sintéticos significa la media de una distribución de tamaños de partículas, por ejemplo obtenida usando dispersión dinámica de luz.

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" o "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un material farmacológicamente inactivo que se utiliza junto con un material farmacológicamente activo para formular las composiciones. Los excipientes farmacéuticamente aceptables comprenden una diversidad de materiales conocidos en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, sacáridos (tales como glucosa, lactosa, y similares), conservantes tales como agentes antimicrobianos, auxiliares de reconstitución, colorantes, solución salina (tal como solución salina tamponada con fosfato), y tampones.

"Protocolo" significa un patrón de administración repetida de inmunoterapéuticos específicos de antígeno a un sujeto. Los protocolos se componen de elementos; por lo tanto, un protocolo comprende uno o más elementos. Dichos elementos del protocolo pueden comprender cantidades de dosificación, frecuencia de dosificación, vías de administración, duración de la dosificación, tasas de dosificación, intervalos entre dosificaciones y combinaciones de cualquiera de los anteriores. En algunos casos, se puede utilizar un protocolo para administrar una o más composiciones a uno o más sujetos de ensayo. Las respuestas inmunitarias en estos sujetos de ensayo pueden evaluarse después para determinar si el protocolo ha sido eficaz, o no, para generar un nivel deseado de un efecto inmunológico. Uno o más de los elementos pueden haberse demostrado previamente en sujetos de ensayo, tales como sujetos no humanos, y después traducirse en protocolos humanos. Por ejemplo, las cantidades de dosificación que se han demostrado en sujetos no humanos se pueden escalar como un elemento de un protocolo humano utilizando técnicas establecidas tales como escalado alimétrico u otros procedimientos de escalado. Se puede determinar si un protocolo ha tenido o no un efecto deseado utilizando cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede obtener una población de células de un sujeto al que se ha administrado de forma repetida una composición mencionada y/o un inmunoterapéutico específico de antígeno descrito en el presente documento de acuerdo con un protocolo específico con el fin de determinar si se produjo la reducción, generación, activación, etc. de células inmunitarias, citoquinas, anticuerpos específicos, etc., o no. Los procedimientos útiles para detectar la presencia y/o el número de células inmunitarias incluyen, pero sin limitación, procedimientos de citometría de flujo (por ejemplo, FACS) y procedimientos de inmunohistoquímica. Los anticuerpos y otros agentes de unión para la tinción específica de marcadores de células inmunitarias están disponibles comercialmente. Los kits de este tipo incluyen normalmente reactivos de tinción para múltiples antígenos que permiten la detección, la separación y/o la cuantificación basada en FACS de una población de células deseada a partir de una población heterogénea de células. En algunos casos, el inmunoterapéutico específico de antígeno se administra de forma repetida a otro sujeto utilizando todos o sustancialmente todos los elementos que comprende el protocolo.

"Protocolo que se ha demostrado previamente que no induce inmunosupresión tras la administración repetida" significa un protocolo en el que se ha demostrado en un punto temporal anterior que uno o más de los elementos de dicho protocolo (hasta e incluido el protocolo completo) no da como resultado inmunosupresión durante al menos un punto temporal durante, preferentemente la totalidad de, la administración repetida.

"Proporcionar" significa una acción o conjunto de acciones que realiza un individuo que suministra un artículo o conjunto de artículos o procedimientos necesarios para llevar a la práctica la presente invención. La acción o el conjunto de acciones pueden considerarse directamente por sí mismas o indirectamente.

"Proporcionar a un sujeto" es cualquier acción o conjunto de acciones que hace que un médico clínico entre en contacto con un sujeto y administre una composición descrita en el presente documento al mismo o que realice un procedimiento descrito en el presente documento sobre el mismo. Preferentemente, el sujeto es uno que necesita una respuesta inmunitaria tolerogénica tal como se describe en el presente documento. La acción o el conjunto de acciones pueden considerarse directamente por sí mismas o indirectamente. En un caso de uno cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el procedimiento comprende, además, proporcionar a un sujeto.

"La administración repetida" o "administrar de forma repetida" o "administrando de forma repetida" y similares significa reforzar o prolongar la persistencia de una tolerancia inmunitaria previamente establecida. Estas operaciones generalmente implican una administración o un ciclo corto de tratamiento en un punto temporal en el que la tolerancia establecida está disminuyendo o corre el riesgo de disminuir. La administración repetida comienza con la o las dosis siguientes del inmunoterapéutico específico de antígeno que se administran después de la administración de una dosis inicial de un inmunoterapéutico específico de antígeno. El inmunoterapéutico específico de antígeno inicial que se administra puede ser el mismo o diferente (en términos de composición, dosificación, etc.) del inmunoterapéutico específico de antígeno que se administra durante la administración repetida. El refuerzo se realiza generalmente de 2 semanas a 1 año, y preferentemente de 1 a 6 meses después de una dosis inicial del inmunoterapéutico específico de antígeno o una administración repetida previa. También se incluyen los casos que implican administraciones periódicas repetidas en un programa de administraciones que se realizan bisemanalmente, semanalmente, quincenalmente o en cualquier otro programa regular.

"Sujeto" significa animales, que incluyen mamíferos de sangre caliente tales como seres humanos y primates; aves; animales domésticos o de granja tales como gatos, perros, ovejas, cabras, vacas, caballos y cerdos; animales de laboratorio tales como ratones, ratas y cobayas; peces; reptiles; animales de zoológico y silvestres; y similares.

"Nanovehículo(s) sintético(s)" significa un objeto discreto que no se encuentra en la naturaleza, y que tiene al menos una dimensión que es inferior o igual a 5 micrómetros de tamaño. Las nanopartículas de albúmina se incluyen generalmente como nanovehículos sintéticos, sin embargo, en determinados casos, los nanovehículos sintéticos no comprenden nanopartículas de albúmina. Los nanovehículos sintéticos pueden no comprender quitosano. En otros casos, los nanovehículos sintéticos no son nanopartículas basadas en lípidos. En otros casos, los nanovehículos sintéticos no comprenden un fosfolípido.

Un nanovehículo sintético puede ser, pero sin limitación, una o una pluralidad de nanopartículas basadas en lípidos (que también se denominan en el presente documento nanopartículas lipídicas, es decir, nanopartículas, en las que la mayor parte del material que compone su estructura son lípidos), nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas, emulsiones basadas en tensioactivos, dendrímeros, futbolenos, nanoalambres, partículas similares a virus (es decir, partículas que están compuestas principalmente por proteínas estructurales víricas, pero que no son infecciosas o tienen baja infectividad), partículas basadas en péptidos o proteínas (que también se denominan en el presente documento partículas proteicas, es decir, partículas en las que la mayor parte del material que forma su estructura son péptidos o proteínas) (tales como nanopartículas de albúmina) y/o nanopartículas que se desarrollan utilizando una combinación de nanomateriales, tales como nanopartículas de lípido-polímero. Los nanovehículos sintéticos pueden presentar una diversidad de formas diferentes, que incluyen, pero sin limitación, esféricas, cuboidales, piramidales, oblongas, cilíndricas, toroidales, y similares. Los nanovehículos sintéticos comprenden una o más superficies. Los nanovehículos sintéticos ilustrativos que pueden adaptarse para su uso en la puesta en práctica de la presente invención comprenden: (1) las nanopartículas biodegradables divulgadas en la patente de Estados Unidos 5.543.158 por Gref et al., (2) las nanopartículas poliméricas de la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 20060002852 por Saltzman et al., (3) las nanopartículas construidas litográficamente de la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 20090028910 por DeSimone et al., (4) la divulgación del documento WO 2009/051837 por von Andrian et al., (5) las nanopartículas divulgadas en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 2008/0145441 por Penades et al., (6) las nanopartículas proteicas divulgadas en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 20090226525 por de los Rios et al., (7) las partículas similares a virus divulgadas en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 20060222652 por Sebbel et al., (8) las partículas similares a virus acopladas a ácido nucleico divulgadas en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 20060251677 por Bachmann et al., (9) las partículas similares a virus divulgadas en los documentos WO2010047839A1 o WO2009106999A2, (10) las nanopartículas nanoprecipitadas divulgadas por P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010), (11) células apoptóticas, cuerpos apoptóticos o los miméticos sintéticos o semisintéticos divulgados en la publicación de Estados Unidos 2002/0086049 o (12) aquellas de Look et al., "Nanogel-based delivery of mycophenolic acid ameliorates systemic lupus erythematosus in mice" J. Clinical Investigation 123(4):1741-1749 (2013). En algunos casos, los nanovehículos sintéticos pueden poseer una relación de aspecto superior a 1:1, 1:1,2, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7, o superior a 1:10.

Los nanovehículos sintéticos que tienen una dimensión mínima igual o inferior a aproximadamente 100 nm, preferentemente igual o inferior a 100 nm, no comprenden una superficie con grupos hidroxilo que activan el complemento o alternatively comprenden una superficie que consiste esencialmente en restos que no son grupos hidroxilo que activan el complemento. En un caso preferido, los nanovehículos sintéticos según la invención que tienen una dimensión mínima igual o inferior a aproximadamente 100 nm, preferentemente igual o inferior a 100 nm, no comprenden una superficie que activa sustancialmente el complemento o alternatively comprenden una superficie que consiste esencialmente en restos que no activan sustancialmente el complemento. En un caso más preferido, los nanovehículos sintéticos según la invención que tienen una dimensión mínima igual o inferior a aproximadamente 100 nm, preferentemente igual o inferior a 100 nm, no comprenden una superficie que activa el complemento o alternatively comprenden una superficie que consiste esencialmente en restos que no activan el complemento. En algunos casos, los nanovehículos sintéticos excluyen las partículas similares a virus. En algunos casos, los nanovehículos sintéticos pueden poseer una relación de aspecto superior a 1:1, 1:1,2, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7, o superior a 1:10.

"Antígeno de células T" significa un antígeno de células T CD4+ o antígeno de células CD8+. "Antígeno de células T CD4+" significa cualquier antígeno que es reconocido por una célula T CD4+ y desencadena una respuesta inmunitaria en una célula T CD4+, por ejemplo, un antígeno que es específicamente reconocido por un receptor de células T en una célula T CD4+ mediante la presentación del antígeno o una porción del mismo unido a una molécula del complejo de histocompatibilidad principal (MHC) de Clase II. "Antígeno de células T CD8+" significa cualquier antígeno que es reconocido por, y desencadena, una respuesta inmunitaria en una célula T CD8+, por ejemplo, un antígeno que es específicamente reconocido por un receptor de células T en una célula T CD8+ mediante la presentación del antígeno o una porción del mismo unido a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de Clase I. En algunos casos, un antígeno que es un antígeno de células T también es un antígeno de células B. En otros casos, el antígeno de células T no es también un antígeno de células B. Los antígenos de células T son generalmente proteínas o péptidos.

Una "proteína terapéutica" se refiere a cualquier proteína o terapia basada en proteínas que se pueden administrar a un sujeto y que tiene un efecto terapéutico. Dichas terapias incluyen terapias de reemplazo de proteínas y de complementación de proteínas. Dichas terapias también incluyen la administración de proteínas exógenas o extrañas, terapias con anticuerpos y terapias celulares o basadas en células. Las proteínas terapéuticas incluyen enzimas, cofactores enzimáticos, hormonas, factores de coagulación sanguínea, citoquinas, factores de crecimiento, anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales. Se describen ejemplos de otras proteínas terapéuticas en otra parte del presente documento. Las proteínas terapéuticas pueden producirse en, sobre o por células y pueden obtenerse a partir de dichas células o administrarse en forma de dichas células. En algunos casos, la proteína terapéutica se produce en, sobre o por células de mamíferos, células de insectos, células de levaduras, células bacterianas, células vegetales, células animales transgénicas, células vegetales transgénicas, etc. La proteína terapéutica puede producirse de forma recombinante en dichas células. La proteína terapéutica también puede producirse en, sobre o por células autólogas que se han transfectado, transducido o manipulado de otro modo para expresarla. Alternativamente, la proteína terapéutica puede administrarse como un ácido nucleico o introduciendo un ácido nucleico en un liposoma, etc. Alternativamente, la proteína terapéutica puede obtenerse a partir de dichas formas y administrarse como la propia proteína terapéutica. Los sujetos, por lo tanto, incluyen cualquier sujeto que haya recibido, esté recibiendo o recibirá cualquiera de las anteriores.

"Respuesta inmunitaria no deseada" se refiere a cualquier respuesta inmunitaria no deseada que es consecuencia de la exposición a un antígeno, fomenta o agrava una enfermedad, trastorno o afección descrito en el presente documento (o un síntoma de la misma), o es un síntoma de una enfermedad, trastorno o condición descrito en el presente documento. Dichas respuestas inmunitarias tienen generalmente un efecto negativo sobre la salud de un sujeto o son sintomáticas de un efecto negativo en la salud de un sujeto. Las respuestas inmunitarias no deseadas incluyen producción de anticuerpos específicos de antígeno, proliferación y/o actividad de células B específicas de antígeno o proliferación y/o actividad de células T CD4+ específicas de antígeno.

C. INFORMACIÓN TÉCNICA RELATIVA A LAS COMPOSICIONES

Inmunoterapéuticos específicos de antígeno

Nanovehículos sintéticos

En algunos casos, los inmunoterapéuticos específicos de antígeno comprenden composiciones de nanovehículos sintéticos que comprenden un inmunomodulador y/o un antígeno, junto con procedimientos relacionados.

Se puede usar una amplia diversidad de nanovehículos sintéticos. En algunos casos, los nanovehículos sintéticos son esferas o esferoides. En algunos casos, los nanovehículos sintéticos son planos o en forma de placa. En algunos casos, los nanovehículos sintéticos son cubos o cúbicos. En algunos casos, los nanovehículos sintéticos son ovalados o elipses. En algunos casos, los nanovehículos sintéticos son cilindros, conos, o pirámides.

En algunos casos, es deseable usar una población de nanovehículos sintéticos que sea relativamente uniforme en términos de tamaño o forma, de modo que cada nanovehículo sintético tenga propiedades similares. Por ejemplo, al menos el 80%, al menos el 90%, o al menos el 95% de los nanovehículos sintéticos, con respecto al número total de nanovehículos sintéticos, pueden tener una dimensión mínima o dimensión máxima que se encuentra dentro del 5%, 10% o 20% del diámetro promedio o dimensión promedio de los nanovehículos sintéticos.

Los nanovehículos sintéticos pueden ser macizos o huecos y pueden comprender una o más capas. En algunos casos, cada una de las capas tiene una composición única y propiedades únicas con respecto a la o las otras capas. Por dar solo un ejemplo, los nanovehículos sintéticos pueden tener una estructura de núcleo/envoltura, en la que el núcleo es una capa (por ejemplo, un núcleo polimérico) y la envoltura es una segunda capa (por ejemplo, una bicapa o monocapa lipídica). Los nanovehículos sintéticos pueden comprender una pluralidad de capas diferentes.

En algunos casos, los nanovehículos sintéticos pueden comprender opcionalmente uno o más lípidos. En algunos casos, un nanovehículo sintético puede comprender un liposoma. En algunos casos, un nanovehículo sintético puede comprender una bicapa lipídica. En algunos casos, un nanovehículo sintético puede comprender una monocapa lipídica. En algunos casos, un nanovehículo sintético puede comprender una micela. En algunos casos, un nanovehículo sintético puede comprender un núcleo que comprende una matriz polimérica rodeada por una capa lipídica (por ejemplo, bicapa lipídica, monocapa lipídica, etc.). En algunos casos, un nanovehículo sintético puede comprender un núcleo no polimérico (por ejemplo, partícula de metal, punto cuántico, partícula de material cerámico, partícula ósea, partícula vírica, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, etc.) rodeado por una capa lipídica (por ejemplo, bicapa lipídica, monocapa lipídica, etc.).

En otros casos, los nanovehículos sintéticos pueden comprender partículas de metal, puntos cuánticos, partículas de material cerámico, etc. En algunos casos, un nanovehículo sintético no polimérico es un agregado de componentes no poliméricos, tales como un agregado de átomos de metales (por ejemplo, átomos de oro).

En algunos casos, los nanovehículos sintéticos pueden comprender opcionalmente una o más entidades anfifílicas. En algunos casos, una entidad anfifílica puede fomentar la producción de nanovehículos sintéticos con estabilidad aumentada, uniformidad mejorada o viscosidad aumentada. En algunos casos, las entidades anfifílicas pueden asociarse con la superficie interior de una membrana lipídica (por ejemplo, bicapa lipídica, monocapa lipídica, etc.). Muchas entidades anfifílicas conocidas en la técnica son adecuadas para su uso en la fabricación de nanovehículos sintéticos. Tales entidades anfifílicas incluyen, pero sin limitación, fosfoglicéridos; fosfatidilcolinas; dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC); dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE); dioleiloxipropiltrietilamonio (DOTMA); dioleoilfosfatidilcolina; colesterol; éster de colesterol; diacilglicerol; succinato de diacilglicerol; difosfatidilglicerol (DPPG); hexanodecanol; alcoholes grasos, tales como polietilenglicol (PEG); polioxi-etilen-9-lauril éter; un ácido graso tensioactivo, tal como ácido palmítico o ácido oleico; ácidos grasos; monoglicéridos de ácidos grasos; diglicéridos de ácidos grasos; amidas de ácidos grasos; glicocolato de trioleato de sorbitán (Span®85); monolaurato de sorbitán (Span®20); polisorbato 20 (Tween®20); polisorbato 60 (Tween®60); polisorbato 65 (Tween®65); polisorbato 80 (Tween®80); polisorbato 85 (Tween®85); monoestearato de polioxi-etileno; surfactina; un poloxómero; un éster de ácido graso de sorbitán, tal como trioleato de sorbitán; lecitina; lisolecitina; fosfatidilserina; fosfatidilinositol, esfingomielina; fosfatidiletanolamina (cefalina); cardiolipina; ácido fosfatídico; cerebrósidos; dicetilfosfato; dipalmitoilfosfatidilglicerol; estearilamina; dodecilamina; hexadecilamina; palmitato de acetilo; ricinoleato de glicerol; esterato de hexadecilo; miristato de isopropilo; tiloxapol; poli(etilenglicol)5000-fosfatidiletanolamina; monoestearato de poli(etilenglicol) 400; fosfolípidos; detergentes sintéticos y/o naturales que tienen propiedades tensioactivas elevadas; desoxicolatos; ciclodextrinas; sales caotrópicas; agentes de apareamiento de iones; y combinaciones de los mismos. Un componente de entidad anfifílica puede ser una mezcla de diferentes entidades anfifílicas. Los expertos en la técnica reconocerán que esta es una lista ilustrativa, no exhaustiva, de sustancias con actividad tensioactiva. Se puede utilizar cualquier entidad anfifílica en la producción de nanovehículos sintéticos.

En algunos casos, los nanovehículos sintéticos pueden comprender opcionalmente uno o más carbohidratos. Los carbohidratos pueden ser naturales o sintéticos. Un carbohidrato puede ser un carbohidrato natural derivatizado. En determinados casos, un carbohidrato comprende monosacáridos o disacáridos, incluidos, pero sin limitación, glucosa, fructosa, galactosa, ribosa, lactosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, celobiosa, manosa, xilosa, arabinosa, ácido glucurónico, ácido galactorónico, ácido manurónico, glucosamina, galatosamina y ácido neurámico. En determinados casos, un carbohidrato es un polisacárido, que incluye, pero sin limitación, pululano, celulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxixelulosa (HC), metilcelulosa (MC), dextrano, ciclodextrano, glucógeno, hidroxietilalmidón, carragenano, glicón, amilosa, quitosano, N,O-carboximetilquitosano, algina y ácido algínico, almidón, quitina, inulina, konjac, glucomanano, pustulano, heparina, ácido hialurónico, curdlano y xantano. En algunos casos, los nanovehículos sintéticos no comprenden (o excluyen específicamente) carbohidratos, tal como un polisacárido. En determinados casos, el carbohidrato puede comprender un derivado de carbohidrato como un alcohol de azúcar, incluidos, pero sin limitación, manitol, sorbitol, xilitol, eritritol, maltitol y lactitol.

En algunos casos, los nanovehículos sintéticos pueden comprender uno o más polímeros. En algunos casos, los nanovehículos sintéticos comprenden uno o más polímeros que son polímeros plurónicos no terminados en metoxi. En algunos casos, al menos el 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% (peso/peso) de los polímeros que componen los nanovehículos

- sintéticos son polímeros plurónicos no terminados en metoxi. En algunos casos, todos los polímeros que componen los nanovehículos sintéticos son polímeros plurónicos no terminados en metoxi. En algunos casos, los nanovehículos sintéticos comprenden uno o más polímeros que son polímeros no terminados en metoxi. En algunos casos, al menos el 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% (peso/peso) de los polímeros que componen los nanovehículos sintéticos son polímeros no terminados en metoxi. En algunos casos, todos los polímeros que componen los nanovehículos sintéticos son polímeros no terminados en metoxi. En algunos casos, los nanovehículos sintéticos comprenden uno o más polímeros que no comprenden polímero plurónico. En algunos casos, al menos el 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% (peso/peso) de los polímeros que componen los nanovehículos sintéticos no comprenden polímero plurónico. En algunos casos, todos los polímeros que componen los nanovehículos sintéticos no comprenden polímero plurónico. En algunos casos, dicho polímero puede estar rodeado por una capa de revestimiento (por ejemplo, liposoma, monocapa lipídica, micela, etc.). En algunos casos, diversos elementos de los nanovehículos sintéticos pueden acoplarse con el polímero.
- Los inmunomoduladores y/o antígenos pueden acoplarse a los nanovehículos sintéticos mediante cualquiera de una serie de procedimientos. Generalmente, el acoplamiento puede ser el resultado de la unión entre los inmunomoduladores y/o antígenos y los nanovehículos sintéticos. Esta unión puede dar como resultado que los inmunomoduladores y/o antígenos se unan a la superficie de los nanovehículos sintéticos y/o estén contenidos (estén encapsulados) dentro de los nanovehículos sintéticos. En algunos casos, sin embargo, los inmunomoduladores y/o antígenos están encapsulados por los nanovehículos sintéticos como resultado de la estructura de los nanovehículos sintéticos en lugar de unirse a los nanovehículos sintéticos. En casos preferidos, el nanovehículo sintético comprende un polímero tal como se describe en el presente documento, y los inmunomoduladores y/o antígenos se acoplan al polímero.
- Cuando el acoplamiento se produce como resultado de la unión entre los inmunomoduladores y/o antígenos y los nanovehículos sintéticos, el acoplamiento puede producirse a través de un resto de acoplamiento. Un resto de acoplamiento puede ser cualquier resto a través del cual un inmunomodulador y/o antígeno se une a un nanovehículo sintético. Dichos restos incluyen enlaces covalentes, tales como un enlace amida o un enlace éster, así como moléculas separadas que unen (covalentemente o no covalentemente) el inmunomodulador y/o antígeno al nanovehículo sintético. Dichas moléculas incluyen enlazadores o polímeros o una unidad de los mismos. Por ejemplo, el resto de acoplamiento puede comprender un polímero cargado al que se une electrostáticamente un inmunomodulador y/o antígeno. Como otro ejemplo, el resto de acoplamiento puede comprender un polímero o una unidad del mismo al que está unido covalentemente.
- En casos preferidos, los nanovehículos sintéticos comprenden un polímero tal como se describe en el presente documento. Estos nanovehículos sintéticos pueden ser completamente poliméricos o pueden ser una mezcla de polímeros y otros materiales.
- En algunos casos, los polímeros de un nanovehículo sintético se asocian para formar una matriz polimérica. En algunos de estos casos, un componente, tal como un inmunomodulador o antígeno, puede asociarse covalentemente con uno o más polímeros de la matriz polimérica. En algunos casos, la asociación covalente está mediada por un enlazador. En algunos casos, un componente puede asociarse de forma no covalente con uno o más polímeros de la matriz polimérica. Por ejemplo, en algunos casos, un componente puede encapsularse dentro, rodearse por, y/o dispersarse por toda una matriz polimérica. Como alternativa o adicionalmente, un componente puede asociarse con uno o más polímeros de una matriz polimérica mediante interacciones hidrofóbicas, interacciones de carga, fuerzas de van der Waals, etc. Se conoce convencionalmente una amplia diversidad de polímeros y procedimientos para formar matrices poliméricas a partir de los mismos.
- Los polímeros pueden ser polímeros naturales o no naturales (sintéticos). Los polímeros pueden ser homopolímeros o copolímeros que comprenden dos o más monómeros. En términos de secuencia, los copolímeros pueden ser aleatorios, de bloques, tal como comprender una combinación de secuencias aleatorias y de bloques. Normalmente, los polímeros son polímeros orgánicos.
- En algunos casos, el polímero comprende un poliéster, un policarbonato, una poliamida o un poliéter, o una unidad de los mismos. En otros casos, el polímero comprende poli(etilenglicol) (PEG), polipropilenglicol, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico-co-glicólico) o una policaprolactona, o una unidad de los mismos. En algunos casos, se prefiere que el polímero sea biodegradable. Por lo tanto, en estos casos, se prefiere que, si el polímero comprende un poliéter, tal como poli(etilenglicol) o polipropilenglicol o una unidad del mismo, el polímero comprenda un copolímero de bloques de un poliéter y un polímero biodegradable de manera que el polímero sea biodegradable. En otros casos, el polímero no comprende únicamente un poliéter o una unidad del mismo, tal como poli(etilenglicol) o polipropilenglicol o una unidad del mismo.
- Otros ejemplos de polímeros adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, polietilenos, policarbonatos (por ejemplo, poli(1,3-dioxan-2-ona)), polianhídridos (por ejemplo, poli(anhídrido sebácico)), poli(fumeratos de propilo), poliamidas (por ejemplo, policaprolactama), poliacetales, poliéteres, poliésteres (por ejemplo, polilactida, poliglicolida, polilactida-co-glicolida, policaprolactona, polihidroxiácido (por ejemplo, poli(β-

hidroxialcanoato))), poli(ortoésteres), policianoacrilatos, poli(alcoholes vinílicos), poliuretanos, polifosfazenos, poli(acrilatos), polimetacrilatos, poliureas, poliestirenos, y poliaminas, polilisina, copolímeros de polilisina-PEG, y poli(etilenimina), copolímeros de poli(etilenimina)-PEG.

En algunos casos, los polímeros incluyen polímeros que han sido aprobados para su uso en seres humanos por la Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos (FDA) bajo 21 CFR § 177.2600, incluidos, pero sin limitación, poliésteres (por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico), policaprolactona, polivalerolactona, poli(1,3-dioxan-2ona)); polianhídridos (por ejemplo, poli(anhídrido sebácico)); poliéteres (por ejemplo, polietilenglicol); poliuretanos; polimetacrilatos; poli(acrilatos); y policianoacrilatos.

En algunos casos, los polímeros pueden ser hidrófilos. Por ejemplo, los polímeros pueden comprender grupos aniónicos (por ejemplo, grupo fosfato, grupo sulfato, grupo carboxilato); grupos catiónicos (por ejemplo, grupo amina cuaternaria); o grupos polares (por ejemplo, grupo hidroxilo, grupo tiol, grupo amina). En algunos casos, un nanovehículo sintético que comprende una matriz polimérica hidrófila genera un entorno hidrófilo dentro del nanovehículo sintético. En algunos casos, los polímeros pueden ser hidrófobos. En algunos casos, un nanovehículo sintético que comprende una matriz polimérica hidrófoba genera un entorno hidrófobo dentro del nanovehículo sintético. La selección de la hidrofiliidad o hidrofobicidad del polímero puede tener un efecto sobre la naturaleza de los materiales que están incorporados (por ejemplo, acoplados) dentro del nanovehículo sintético.

En algunos casos, los polímeros se pueden modificar con uno o más restos y/o grupos funcionales. Puede utilizarse una diversidad de restos o grupos funcionales. En algunos casos, los polímeros se pueden modificar con polietilenglicol (PEG), con un carbohidrato, y/o con poliacetales acíclicos derivados de polisacáridos (Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301). Se pueden utilizar las enseñanzas generales de la patente de Estados Unidos N° 5543158 por Gref et al., o la publicación WO WO2009/051837 por Von Andrian et al.

En algunos casos, los polímeros se pueden modificar con un lípido o un grupo de ácido graso. En algunos casos, un grupo de ácido graso puede ser uno o más de ácido butírico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behénico o lignocérico. En algunos casos, un grupo de ácido graso puede ser uno o más de ácido palmitoleico, oleico, vaccénico, linoleico, alfa-linoleico, gamma-linoleico, araquidónico, gadoleico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico, o erúico.

En algunos casos, los polímeros pueden ser poliésteres, incluidos copolímeros que comprenden unidades de ácido láctico y ácido glicólico, tales como poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) y poli(lactida-co-glicolida), denominados colectivamente en el presente documento "PLGA"; y homopolímeros que comprenden unidades de ácido glicólico, denominados en el presente documento "PGA", y unidades de ácido láctico, tales como poli-ácido L-láctico, poli-ácido D-láctico, poli-ácido D,L-láctico, poli-L-lactida, poli-D-lactida, y poli-D,L-lactida, denominados colectivamente en el presente documento "PLA". En algunos casos, los poliésteres ilustrativos incluyen, por ejemplo, polihidroxiácidos; copolímeros de PEG y copolímeros de lactida y glicolida (por ejemplo, copolímeros de PLA-PEG, copolímeros de PGA-PEG, copolímeros de PLGA-PEG, y derivados de los mismos. En algunos casos, los poliésteres incluyen, por ejemplo, poli(caprolactona), copolímeros de poli(caprolactona)-PEG, poli(L-lactida-co-L-lisina), poli(éster de serina), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina), poli[ácido α -(4-aminobutil)-L-glicólico], y derivados de los mismos.

En algunos casos, un polímero puede ser PLGA. El PLGA es un copolímero biocompatible y biodegradable de ácido láctico y ácido glicólico, y diversas formas de PLGA se caracterizan por la relación de ácido láctico:ácido glicólico. El ácido láctico puede ser ácido L-láctico, ácido D-láctico, o ácido D,L-láctico. La tasa de degradación del PLGA se puede ajustar alterando la relación ácido láctico:ácido glicólico. En algunos casos, el PLGA se caracteriza por una relación ácido láctico:ácido glicólico de aproximadamente 85:15, aproximadamente 75:25, aproximadamente 60:40, aproximadamente 50:50, aproximadamente 40:60, aproximadamente 25:75 o aproximadamente 15:85.

En algunos casos, los polímeros pueden ser uno o más polímeros acrílicos. En determinados casos, los polímeros acrílicos incluyen, por ejemplo, copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de metacrilato de aminoalquilo, poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), copolímero de ácido metacrílico-alquilamida, poli(metacrilato de metilo), poli(anhídrido de ácido metacrílico), metacrilato de metilo, polimetacrilato, copolímero de poli(metacrilato de metilo), poli(acrilamida), copolímero de metacrilato de aminoalquilo, copolímeros de metacrilato de glicidilo, policianoacrilatos, y combinaciones que comprenden uno o más de los polímeros anteriores. El polímero acrílico puede comprender copolímeros completamente polimerizados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico con un bajo contenido de grupos amonio cuaternario.

En algunos casos, los polímeros pueden ser polímeros catiónicos. En general, los polímeros catiónicos pueden condensar y/o proteger cadenas de ácidos nucleicos cargadas negativamente (por ejemplo, ADN o derivados del mismo). Los polímeros que contienen amina, tales como poli(lisina) (Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97; y Kabanov et al., 1995, Bioconjugate Chem., 6:7), poli(etilenimina) (PEI; Boussif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297), y dendrímeros de poli(amidoamina) (Kukowska-Latallo et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:4897; Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703; y Haensler et al., 1993, Bioconjugate Chem., 4:372) están cargados positivamente a pH fisiológico, forman pares de iones con ácidos nucleicos y median en la transfección en

una diversidad de líneas celulares. En algunos casos, los nanovehículos sintéticos pueden no comprender (o pueden excluir) polímeros catiónicos.

En algunos casos, los polímeros pueden ser poliésteres degradables que portan cadenas laterales catiónicas (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:11010; Kwon et al., 1989, *Macromolecules*, 22:3250; Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633; y Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23:3399). Los ejemplos de estos poliésteres incluyen poli(L-lactida-co-L-lisina) (Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:11010), poli(éster de serina) (Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23:3399), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina) (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; y Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633), y poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina) (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; y Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633).

Las propiedades de estos y otros polímeros, y los procedimientos para prepararlos, son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 6.123.727; 5.804.178; 5.770.417; 5.736.372; 5.716.404; 6.095.148; 5.837.752; 5.902.599; 5.696.175; 5.514.378; 5.512.600; 5.399.665; 5.019.379; 5.010.167; 4.806.621; 4.638.045; y 4.946.929; Wang et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:9480; Lim et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:2460; Langer, 2000, *Acc. Chem. Res.*, 33:94; Langer, 1999, *J. Control. Release*, 62:7; y Urrich et al., 1999, *Chem. Rev.*, 99:3181). Más en general, se describe una diversidad de procedimientos para sintetizar determinados polímeros adecuados en *Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts*, Ed. de Goethals, Pergamon Press, 1980; *Principles of Polymerization* de Odian, John Wiley & Sons, Cuarta edición, 2004; *Contemporary Polymer Chemistry* de Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, *Nature*, 390:386; y en las patentes de Estados Unidos 6.506.577, 6.632.922, 6.686.446 y 6.818.732.

En algunos casos, los polímeros pueden ser polímeros lineales o ramificados. En algunos casos, los polímeros pueden ser dendrímeros. En algunos casos, los polímeros pueden estar sustancialmente reticulados entre sí. En algunos casos, los polímeros pueden estar sustancialmente exentos de reticulaciones. En algunos casos, los polímeros pueden utilizarse sin someterlos a una etapa de reticulación. Además, debe entenderse que los nanovehículos sintéticos pueden comprender copolímeros de bloques, copolímeros de injerto, combinaciones, mezclas y/o aductos de cualquiera de los polímeros anteriores y de otros polímeros. Los expertos en la técnica reconocerán que los polímeros enumerados en el presente documento representan una lista ilustrativa, no exhaustiva, de polímeros que pueden ser útiles.

En algunos casos, los nanovehículos sintéticos no comprenden un componente polimérico. En algunos casos, los nanovehículos sintéticos pueden comprender partículas metálicas, puntos cuánticos, partículas de material cerámico, etc. En algunos casos, un nanovehículo sintético no polimérico es un agregado de componentes no poliméricos, tal como un agregado de átomos metálicos (por ejemplo, átomos de oro).

Las composiciones pueden comprender nanovehículos sintéticos en combinación con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como conservantes, tampones, solución salina, o solución salina tamponada con fosfato. Las composiciones se pueden preparar usando técnicas de fabricación y composición farmacéuticas convencionales para obtener formas de dosificación útiles. En un caso, los nanovehículos sintéticos se suspenden en una solución salina estéril para inyección junto con un conservante.

En algunos casos, cuando se preparan nanovehículos sintéticos como vehículos, los procedimientos para el acoplamiento de componentes a los nanovehículos sintéticos pueden ser útiles. Si el componente es una molécula pequeña, puede resultar ventajoso unir el componente a un polímero antes del ensamblaje de los nanovehículos sintéticos. En algunos casos, también puede ser una ventaja preparar los nanovehículos sintéticos con grupos de superficie que se utilizan para acoplar el componente al nanovehículo sintético mediante el uso de estos grupos de superficie en lugar de unir el componente a un polímero y después utilizar este polímero conjugado en la construcción de nanovehículos sintéticos.

En determinados casos, el acoplamiento puede ser un enlazador covalente. En algunos casos, los péptidos se pueden acoplar covalentemente a la superficie externa a través de un enlazador de 1,2,3-triazol formado mediante la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de grupos azido en la superficie del nanovehículo con antígeno o inmunomodulador que contiene un grupo alquino o por la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de alquinos en la superficie del nanovehículo con antígenos o inmunomoduladores que contienen un grupo azido. Dichas reacciones de cicloadición se realizan preferentemente en presencia de un catalizador de Cu(I) junto con un ligando de Cu(I) adecuado y un agente reductor para reducir el compuesto de Cu(II) a un compuesto de Cu(I) catalítico activo. Esta cicloadición de azidaalquino catalizada por Cu(I) (CuAAC) también puede denominarse reacción de clic.

Adicionalmente, el acoplamiento covalente puede comprender un enlazador covalente que comprende un enlazador de amida, un enlazador de disulfuro, un enlazador de tioéter, un enlazador de hidrazona, un enlazador de hidrazida, un enlazador de imina u oxima, un enlazador de urea o tiourea, un enlazador de amidina, un enlazador de amina y un enlazador de sulfonamida.

Un enlazador de amida se forma a través de un enlace amida entre una amina en un componente tal como un antígeno o inmunomodulador con el grupo ácido carboxílico de un segundo componente, tal como el nanovehículo. El enlace

amida en el enlazador se puede producir utilizando cualquiera de las reacciones de formación de enlaces amida convencionales con aminoácidos adecuadamente protegidos y ácido carboxílico activado, tal como éster activado con N-hidroxisuccinimida.

5 Un enlazador de disulfuro se produce mediante la formación de un enlace disulfuro (S-S) entre dos átomos de azufre de la forma, por ejemplo, R1-S-S-R2. Se puede formar un enlace disulfuro mediante el intercambio de tiol de un componente que contiene un grupo tiol/mercaptano (-SH) con otro grupo tiol activado en un polímero o nanovehículo o un nanovehículo que contiene grupos tiol/mercaptano con un componente que contiene un grupo tiol activado.

10 Un enlazador de triazol, específicamente un 1,2,3-triazol de la forma



15 en la que R1 y R2 pueden ser cualesquiera entidades químicas, se produce mediante la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de una azida unida a un primer componente, tal como el nanovehículo con un alquino terminal unido a un segundo componente, tal como el inmunomodulador o antígeno. La reacción de cicloadición 1,3-dipolar se realiza con o sin un catalizador, preferentemente con catalizador de Cu(I), que enlaza los dos componentes a través de una función 1,2,3-triazol. Esta química se describe en detalle por Sharpless et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41(14), 2596, (2002) y Meldal, et al, Chem. Rev., 2008, 108(8), 2952-3015 y a menudo se denomina una reacción de "clic" o CuAAC.

20 En algunos casos, se prepara un polímero que contiene un grupo azida o alquino, terminal con respecto a la cadena polimérica. Este polímero se utiliza después para preparar un nanovehículo sintético de tal manera que una pluralidad de grupos alquino o azida estén dispuestos en la superficie de ese nanovehículo. Alternativamente, el nanovehículo sintético puede prepararse por otra ruta y posteriormente funcionalizarse con grupos alquino o azida. El componente se prepara con la presencia de un grupo alquino (si el polímero contiene una azida) o un grupo azida (si el polímero contiene un alquino). A continuación, se deja que el componente reaccione con el nanovehículo mediante la reacción de cicloadición 1,3-dipolar con o sin un catalizador que acopla covalentemente el componente a la partícula a través del enlazador 1,2,3-triazol 1,4-disustituido.

30 Un enlazador de tioéter se produce mediante la formación de un enlace azufre-carbono (tioéter) en la forma, por ejemplo, R1-S-R2. El tioéter se puede preparar mediante la alquilación de un grupo tiol/mercaptano (-SH) presente en un componente con un grupo alquilante tal como haluro o epóxido presente en un segundo componente. Los enlazadores de tioéter también pueden formarse mediante la adición de Michael de un grupo tiol/mercaptano presente en un componente a un grupo alqueno deficiente en electrones presente en un segundo componente que contiene un grupo maleimida o un grupo vinilsulfona como el aceptor de Michael. De otra forma, los enlazadores de tioéter se pueden preparar mediante la reacción radicalaria tiol-eno de un grupo tiol/mercaptano presente en un componente con un grupo alqueno presente en un segundo componente.

40 Un enlazador de hidrazona se produce mediante la reacción de un grupo hidrazida presente en un componente con un grupo aldehído/cetona presente en el segundo componente.

Un enlazador de hidrazida se forma por la reacción de un grupo hidrazina presente en un componente con un grupo ácido carboxílico presente en el segundo componente. Dicha reacción se realiza generalmente utilizando una química similar a la formación de un enlace amida, en que el ácido carboxílico se activa con un reactivo activador

45 Un enlazador de imina u oxima se forma mediante la reacción de un grupo amina o N-alcoxiamina (o aminooxi) presente en un componente con un grupo aldehído o cetona presente en el segundo componente.

50 Un enlazador de urea o tiourea se prepara mediante la reacción de un grupo amina presente en un componente con un grupo isocianato o tioisocianato presente en el segundo componente.

Un enlazador de amidina se prepara mediante la reacción de un grupo amina presente en un componente con un grupo imidoéster presente en el segundo componente.

55 Un enlazador de amina se produce mediante la reacción de alquilación de un grupo amina presente en un componente con un grupo alquilante tal como haluro, epóxido, o grupo éster de sulfonato presente en el segundo componente. Alternativamente, también se puede producir un enlazador de amina mediante aminación reductora de un grupo amina presente en un componente con un grupo aldehído o cetona presente en el segundo componente con un reactivo reductor adecuado, tal como cianoborohidruro de sodio o triacetoxiborohidruro de sodio.

60 Un enlazador de sulfonamida se produce mediante la reacción de un grupo amina presente en un componente con un grupo haluro de sulfonilo (tal como cloruro de sulfonilo) presente en el segundo componente.

Un enlazador de sulfona se produce mediante la adición de Michael de un nucleófilo a una vinilsulfona. La vinilsulfona o el nucleófilo pueden estar en la superficie del nanovehículo o unidos a un componente.

El componente también puede conjugarse con el nanovehículo por medio de procedimientos de conjugación no covalentes. Por ejemplo, un antígeno o inmunomodulador cargado negativamente puede conjugarse con un nanovehículo cargado positivamente mediante adsorción electrostática. Un componente que contiene un ligando metálico también puede conjugarse con un nanovehículo que contiene un complejo metálico mediante un complejo de metal-ligando.

En algunos casos, el componente puede unirse a un polímero, por ejemplo, ácido poliláctico-bloque-poli(etilenglicol), antes del ensamblaje del nanovehículo sintético o el nanovehículo sintético puede formarse con grupos reactivos o activables en su superficie. En este último caso, el componente puede prepararse con un grupo que sea compatible con la química de unión que se presenta por la superficie de los nanovehículos sintéticos. En otros casos, se puede unir un componente peptídico a VLP o liposomas utilizando un enlazador adecuado. Un enlazador es un compuesto o reactivo capaz de acoplar dos moléculas entre sí. En un caso, el enlazador puede ser un reactivo homobifuncional o heterobifuncional tal como se describe en Hermanson 2008. Por ejemplo, un nanovehículo sintético de VLP o liposomas que contiene un grupo carboxílico en la superficie se puede tratar con un enlazador homobifuncional, dihidrazida adipica (ADH), en presencia de EDC para formar el nanovehículo sintético correspondiente con el enlazador ADH. El nanovehículo sintético unido a ADH resultante se conjuga después con un componente peptídico que contiene un grupo ácido a través del otro extremo del enlazador ADH en NC para producir el correspondiente conjugado de VLP o péptido liposómico.

Para una descripción detallada de procedimientos de conjugación disponibles, véase Hermanson GT "Bioconjugate Techniques", 2ª edición, publicado por Academic Press, Inc., 2008. Además de la unión covalente, el componente puede acoplarse mediante adsorción a un nanovehículo sintético formado previamente o puede acoplarse mediante encapsulación durante la formación del nanovehículo sintético.

Antígenos modificados

En algunos casos, cualquiera de las composiciones citadas y/o los inmunoterapéuticos específicos de antígeno citados puede comprender un antígeno modificado, en el que la modificación puede servir para una diversidad de propósitos, incluidos, pero sin limitación, una estabilidad aumentada en circulación (tal como pegilación de antígenos proteicos o peptídicos), sensibilidad reducida a la degradación de la peptidasa (tal como la sustitución de aminoácidos naturales por aminoácidos no naturales) y para potenciar el rendimiento tolerogénico (tal como la unión a eritrocitos).

En un caso preferido, el antígeno modificado comprende una proteína de fusión que comprende un antígeno de interés fusionado con un resto de unión que se une a eritrocitos. Un ejemplo de dicho resto de unión comprende un péptido sintético de 12 aa (ERY1) descrito en la literatura como H₂N-WMVLPWLPGTLDGGSGCRGCONH₂ (SEQ ID NO: 1), que incluye una secuencia 12-mérica descrita en la literatura como un ligante de glicoforina-A de ratón. Se ha descrito que la región GGSG sirve como enlazador para el residuo de cisteína utilizado para la conjugación, y se ha descrito que el residuo de arginina flanqueante sirve para reducir el pKa y, por lo tanto, para aumentar la reactividad del residuo de cisteína. En otro caso, se puede generar una proteína de fusión que comprende el antígeno de interés fusionado con un resto de unión tal como un resto de unión a glicoforina A murina o un resto equivalente de este tipo para otras especies (por ejemplo, seres humanos). En un caso específico, el Ab TER-119 de unión a glucoforina A murina, o fragmentos del mismo (tales como un scFv de TER-119, se pueden fusionar con el antígeno de interés. Véase, en general, S. Kontos et al., "Engineering antigens for in situ erythrocyte binding induces T-cell deletion" Proc Natl Acad Sci USA. 2 de enero de 2013; 110(1):E60-8 ("Kontos"). Se pueden generar restos de unión a eritrocitos adicionales utilizando la presentación de fagos o enfoques de fragmentos mAb/mAb generalmente divulgados en el artículo de Kontos y en la literatura relevante.

Se pueden formular antígenos modificados en una diversidad de formas, para su administración por medio de una diversidad de vías. En otra parte del presente documento se divulgan enfoques de formulación apropiados y vías útiles y se pueden aplicar a composiciones y/o inmunoterapéuticos específicos de antígeno de acuerdo con la presente divulgación.

Antígeno expresado:

En algunos casos, las composiciones enumeradas y/o los inmunoterapéuticos específicos de antígeno enumerados pueden comprender un antígeno expresado, en los que el antígeno expresado se expresa después de la administración de un constructo genético, preferentemente un constructo genético no altamente inmunogénico. Ejemplos de dichos constructos genéticos se conocen en la técnica e incluyen, pero sin limitación, inyección directa, liposómica, lípido catiónico; o partículas condensadas de ADN/ARN, o administración mediante pistola génica de: diversos constructos que comprenden ADN o ARN; plásmidos; o ADN o ARN desnudo (que incluyen ADNc, ARN mensajero, ARN mensajero modificado y formas de ARNi). Véase, en general, J. R. Ohlfest et al., "Phenotypic correction and long-term expression of factor VIII in hemophilic mice by immunotolerization and nonviral gene transfer

using the Sleeping Beauty transposon system" Blood 2005;105:2691-2698; A Tautzenberger et al., "Nanoparticles and their potential for application in bone" Int'l. J. of Nanomedicine 2012;74545-4557. Los ARN mensajeros modificados, incluida la inyección directa de los mismos, se divulgan en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 2013/0115272 por de Fougerolles et al. y en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 2012/0251618 por Schrum et al. Cualquiera de las proteínas enumeradas en otra parte del presente documento, o conocidas en general en la técnica, se puede considerar para su administración en el contexto de un antígeno expresado.

Se pueden formular antígenos expresados en una diversidad de formas, para su administración por medio de una diversidad de vías. en otra parte del presente documento se divulgan enfoques de formulación apropiados y vías útiles y se pueden aplicar a composiciones y/o inmunoterapéuticos específicos de antígeno de acuerdo con la presente divulgación.

Antígenos

Los antígenos útiles en la puesta en práctica de la presente invención se pueden seleccionar de un amplio abanico de antígenos, incluidos los antígenos exógenos y endógenos.

Antígenos exógenos

Los antígenos exógenos, tal como se indica en otra parte del presente documento, pueden comprender proteínas terapéuticas, antígenos modificados y antígenos expresados.

Las proteínas terapéuticas pueden comprender cualquiera de las proteínas terapéuticas, o fragmentos o derivados de las mismas, descritos en el presente documento. Las proteínas terapéuticas incluyen, pero sin limitación, proteínas terapéuticas infundibles, enzimas, cofactores enzimáticos, hormonas, factores de coagulación de la sangre, citoquinas e interferones, factores de crecimiento, anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales, y proteínas asociadas con la enfermedad de Pompe (por ejemplo, alglucosidasa alfa, rhGAA (por ejemplo, Myozyme y Lumizyme (Genzyme)) (por ejemplo, que se administran a un sujeto como terapia de reemplazo). Las proteínas terapéuticas también incluyen proteínas implicadas en la cascada de coagulación sanguínea. Las proteínas terapéuticas incluyen, pero sin limitación, Factor VIII, Factor VII, Factor IX, Factor V, Factor von Willebrand, Factor von Heldebrant, activador del plasminógeno tisular, insulina, hormona del crecimiento, eritropoyetina alfa, VEGF, trombopoyetina, lisozima y antitrombina. Las proteínas terapéuticas también incluyen adipocinas, tales como leptina y adiponectina. Otros ejemplos de proteínas terapéuticas son tal como se describen a continuación y en otra parte del presente documento. También se incluyen fragmentos o derivados de cualquiera de los proteínas terapéuticas descritas como el antígeno.

Los ejemplos de proteínas terapéuticas utilizadas en la terapia de reemplazo enzimático de sujetos que tienen un trastorno de almacenamiento lisosómico incluyen, pero sin limitación, imiglucerasa para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher (por ejemplo, CEREZYME™), a-galactosidasa A (a-gal A) para el tratamiento de la enfermedad de Fabry (por ejemplo, agalsidasa beta, FABRYZYME™), a-glucosidasa ácida (GAA) para el tratamiento de la enfermedad de Pompe (por ejemplo, alglucosidasa alfa, LUMIZYME™, MYOZYME™), arilsulfatasa B para el tratamiento de mucopolisacaridosis (por ejemplo, laronidasa, ALDURAZYME™, idursulfasa, ELAPRASE™, arilsulfatasa B, NAGLAZYME™).

Los ejemplos de enzimas incluyen oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas.

Los ejemplos de hormonas incluyen melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), serotonina, tiroxina (o tetrayodotironina) (una hormona tiroidea), triyodotironina (una hormona tiroidea), epinefrina (o adrenalina), norepinefrina (o noradrenalina), dopamina (u hormona inhibidora de la prolactina), hormona antimulleriana (o factor u hormona inhibidora de Muller), adiponectina, hormona adrenocorticotrópica (o corticotropina), angiotensinógeno y angiotensina, hormona antidiurética (o vasopresina, arginina vasopresina) o péptido atrio-natriurético, calcitonina, colecistoquinina, hormona liberadora de corticotropina, eritropoyetina, hormona estimulante del folículo, gastrina, grelina, glucagón, péptido similar al glucagón (GLP-1), GIP, hormona liberadora de gonadotropina, hormona liberadora de hormona del crecimiento, hormona coriónica humana, gonadotropina lactógeno placentario humano, hormona del crecimiento, inhibina, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina (o somatomedina), leptina, hormona luteinizante, hormona estimulante de melanocitos, orexina, oxitocina, hormona paratiroidea, prolactina, relaxina, secretina, somatostatina, trombopoyetina, hormona estimulante del tiroides (o tirotrópina), hormona liberadora de tirotrópina, cortisol, aldosterona, testosterona, deshidroepiandrosterona, androstenediona, dihidrotestosterona, estradiol, estorna, estriol, progesterona, calcitriol (1,25-dihidroxivitamina D3), calcidiol (25-hidroxivitamina D3), prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina, tromboxano, hormona liberadora de prolactina, lipotropina, péptido natriurético cerebral, neuropéptido Y, histamina, endotelina, polipéptido pancreático, renina y encefalina.

Los ejemplos de sangre y factores de coagulación de la sangre incluyen Factor I (fibrinógeno), Factor II (protrombina), factor tisular, Factor V (proacelerina, factor lábil), Factor VII (factor estable, proconvertina), Factor VIII (globulina antihemofílica), Factor IX (factor Christmas o componente de tromboplastina plasmática), Factor X (factor de Stuart-Prower), Factor Xa, Factor XI, Factor XII (factor de Hageman), Factor XIII (factor estabilizador de fibrina), factor von Willebrand, precalicreína (factor de Fletcher), cininógeno de alto peso molecular (HMWK) (factor de Fitzgerald),

fibronectina, fibrina, trombina, antitrombina III, cofactor de heparina II, proteína C, proteína S, proteína Z, inhibidor de proteasa relacionado con proteína Z (ZPI), plasminógeno, alfa 2-antiplasmina, activador tisular del plasminógeno (tPA), uroquinasa, inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI1), inhibidor del activador del plasminógeno-2 (PAI2), procoagulante del cáncer y epoetina alfa (Epogen, Procrit).

Los ejemplos de citoquinas incluyen linfoquinas, interleuquinas y quimioquinas, citoquinas de tipo 1, tales como IFN- γ , TGF- β , y citoquinas de tipo 2, tales como IL-4, IL-10 e IL-13.

Los ejemplos de factores de crecimiento incluyen adrenomedulina (AM), angiopoyetina (Ang), factor de motilidad autocrina, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de diferenciación del crecimiento 9 (GDF9), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de hepatoma (HDGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor estimulante de la migración, miostatina (GDF-8), factor de crecimiento nervioso (NGF) y otras neurotrofinas, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), vía de señalización Wnt, factor de crecimiento placentario (PIGF), [(somatotropina bovina fetal)] (FBS), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-7.

Los ejemplos de anticuerpos monoclonales incluyen Abagovomab, Abciximab, Adalimumab, Adecatumumab, Afelimomab, Afutuzumab, Alacizumab pegol, ALD, Alemtuzumab, Altumomab pentetato, Anatumomab mafenatox, Anrukinzumab, globina anti-timocitos, Apolizumab, Arcitumomab, Aselizumab, Atlizumab (tocilizumab), Atorolimomab, Bapineuzumab, Basiliximab, Bavituximab, Bectumomab, Belimumab, Benralizumab, Bertilimumab, Besilesomab, Bevacizumab, Biciromab, Bivatuzumab mertansina, Blinatumomab, Brentuximab vedotina, Briakinumab, Canakinumab, Cantuzumab mertansina, Capromab pendetida, Catumaxomab, Cedelizumab, Certolizumab pegol, Cetuximab, Citatuzumabbogatox, Cixutumumab, Clenoliximab, Clivatuzumab tetraxetano, Conatumumab, Dacetuzumab, Daclizumab, Daratumumab, Denosumab, Detumomab, Dorlimomab aritox, Dorlixizumab, Ecomeximab, Eculizumab, Edobacumab, Edrecolomab, Efalizumab, Efungumab, Elotuzumab, Elsilimomab, Enlimomab pegol, Eritumomab cituxetano, Epratuzumab, Erlizumab, Ertumaxomab, Etaracizumab, Exbivirumab, Fanolesomab, Faralimomab, Farletuzumab, Felvizumab, Fezakinumab, Figitumumab, Fontolizumab, Foravirumab, Fresolimumab, Galiximab, Gantenerumab, Gavilimomab, Gemtuzumab ozogamicina, GC1008, Girentuximab, Glembatumumab vedotina, Golimumab, Gomiliximab, Ibalizumab, Ibritumomab tiuxetano, Igovomab, Imciromab, Infliximab, Intetumumab, Inolimomab, Inotuzumab ozogamicina, Ipilimumab, Iratumumab, Keliximab, Labetuzumab, Lebrikizumab, Lemalesomab, Lerdelimomab, Lexatumumab, Libivirumab, Lintuzumab, Lorvotuzumab mertansina, Lucatumumab, Lumiliximab, Mapatumumab, Maslimomab, Matuzumab, Mepolizumab, Metelimomab, Milatuzumab, Minretumomab, Mitumomab, Morolimomab, Motavizumab, Muromonab-CD3, Nacolumab tafenatox, Naptumomab estafenatox, Natalizumab, Nebacumab, Necitumumab, Nerelimomab, Nimotuzumab, Nofetumomab merpentano, Ocrelizumab, Odulimomab, Ofatumumab, Olaratumab, Omalizumab, Oportuzumab monatox, Oregovomab, Otelixizumab, Pagibaximab, Palivizumab, Panitumumab, Panobacumab, Pascolizumab, Pentumomab, Pertuzumab, Pexelizumab, Pintumomab, Priliximab, Pritumomab, Rafivirumab, Ramucirumab, Ranibizumab, Raxibacumab, Regavirumab, Reslizumab, Rilotumomab, Rituximab, Robatumumab, Rontalizumab, Rovelizumab, Ruplizumab, Satumomab pendetida, Sevirumab, Sibrotuzumab, Sifalimumab, Siplizumab, Siltuximab, Solanezumab, Sonopczumab, Sontuzumab, Stamulumab, Sulesomab, Tacatuzumab tetraxetano, Tadocizumab, Talizumab, Tanezumab, Taplitumomab paptox, Tefibazumab, Telimomab aritox, Tenatumomab, Teneliximab, Teplizumab, Ticilimumab (tremelimomab), Tigatuzumab, Tocilizumab (atlizumab), Toralizumab, Tositumomab, Trastuzumab, Tremelimomab, Tucotuzumab celmoleuquina, Tuvirumab, Urtoxazumab, Ustekinumab, Vapaliximab, Vedolizumab, Veltuzumab, Vepalimomab, Visilizumab, Volociximab, Votumumab, Zalutumumab, Zanolimumab, Ziralimumab y Zolimumab aritox.

Los ejemplos de terapia de infusión o proteínas terapéuticas inyectables incluyen, por ejemplo, Tocilizumab (Roche/Actemra®), alfa-1 antitripsina (Kamada/AAT), Hematide® (Affymax y Takeda, péptido sintético), albinterferón alfa-2b (Novartis/Zalbin™), Rhucin® (Pharming Group, terapia de reemplazo del inhibidor de C1), tesamorelina (Theratechnologies/Egrifta, factor de liberación de hormona de crecimiento sintético), ocrelizumab (Genentech, Roche y Biogen), belimumab (GlaxoSmithKline/Benlysta®), pegloticasa (Savient Pharmaceuticals/Krystexxa™), pegsiticasa, taliglucerasa alfa (Protalix/Uplyso), agalsidasa alfa (Shire/Replagal®), velaglucerasa alfa (Shire).

Otras proteínas terapéuticas útiles de acuerdo con aspectos de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica, y la invención no está limitada a este respecto.

Los antígenos exógenos adicionales pueden comprender antígenos modificados o antígenos expresados.

Los antígenos modificados, tales como constructos de fusión entre un antígeno de interés y un resto dirigido a eritrocitos, se han descrito en otra parte del presente documento y pueden ser útiles en la puesta en práctica de la presente invención.

Los antígenos expresados, tales como los antígenos generados por la administración de vectores de genes no inmunogénicos o poco inmunogénicos, ADN plasmídico, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN o ARN), o ácidos nucleicos modificados, se han descrito en otra parte del presente documento y pueden ser útiles en la puesta en práctica de la presente invención.

5

Antígenos endógenos

Algunas composiciones descritas en el presente documento comprenden antígenos que son antígenos endógenos. Los antígenos endógenos comprenden autoantígenos, tales como los que se encuentran en enfermedades autoinmunitarias. Los autoantígenos incluyen, pero sin limitación, los que se encuentran en espondilitis anquilosante; pénfigo ampolloso; artritis reumatoide; esclerosis múltiple; diabetes, que incluye, pero sin limitación, diabetes mellitus insulino-dependiente, diabetes mellitus, diabetes juvenil, diabetes autoinmunitaria espontánea, diabetes mellitus inmunomediada o de Tipo I; eccema; enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa), tal como enfermedad inflamatoria del intestino autoinmunitaria; lupus o lupus eritematoso sistémico; esclerosis múltiple; cirrosis biliar primaria; psoriasis; sarcoidosis; esclerosis sistémica; esclerodermia; tiroiditis; enfermedad tiroidea autoinmunitaria; tiroiditis de Hashimoto; tirotoxicosis; alopecia areata; enfermedad de Graves; síndrome de Guillain-Barré; enfermedad celíaca; síndrome de Sjogren; fiebre reumática; gastritis, gastritis atrófica autoinmunitaria; hepatitis autoinmunitaria; insulinitis; ooforitis; orquitis; uveítis; uveítis facogénica; miastenia gravis; mixedema primario; anemia perniciosa; colangitis esclerosante primaria; anemia hemolítica autoinmunitaria; enfermedad de Addison; esclerodermia; síndrome de Goodpasture; nefritis, por ejemplo, glomerulonefritis; psoriasis; pénfigo vulgar; penfigoide; oftalmía simpática; púrpura trombocitopénica idiopática; feucopenia idiopática; granulomatosis de Wegener y poli/dermatomiositis.

Algunos ejemplos de enfermedades autoinmunitarias adicionales, autoantígenos asociados, y autoanticuerpos, que se contemplan, se describen en la tabla 1 a continuación:

25

Tipo de autoanticuerpo	Autoanticuerpo	Autoantígeno	Enfermedad o trastorno autoinmunitario
Anticuerpos antinucleares	Autoanticuerpos anti-SSA/Ro	Ribonucleoproteínas	Lupus eritematoso sistémico, bloqueo cardíaco neonatal, síndrome de Sjögren primario
	Autoanticuerpos anti-La/SS-B	Ribonucleoproteínas	Síndrome de Sjögren primario
	Anticuerpos anticentrómero	Centrómero	Síndrome de CREST
	Anticuerpo nuclear antineuronal-2	Ri [se necesita desambiguación]	Opsoclono
	Anti-ADNbc	ADN bicatenario	SLE
	Anti-Jo 1	Histidina-ARNt ligasa	Miopatía inflamatoria
	Anti-Smith	Proteínas centrales snRNP	SLE
	Anticuerpos anti-topoisomerasa	Topoisomerasa de tipo I	Esclerosis sistémica (anticuerpos anti-Scl-70)
	Anticuerpos anti-histona	Histonas	LES y LE inducido por fármacos[2]
	Anticuerpos anti-p62 [3]	Nucleoporina 62	Cirrosis biliar primaria[3] [4] [5]
	Anticuerpos anti-sp 100 [4]	Antígeno nuclear Sp100	
	Anticuerpos anti-glicoproteína-210[5]	Nucleoporina 210 kDa	
Anticuerpos anti-transglutaminasa	Anti-tTG		Enfermedad celíaca
	Anti-eTG		Dermatitis herpetiformis
Anticuerpos anti-gangliósidos		Gangliósido GQ1B	Síndrome de Miller-Fisher
		Gangliósido GD3	Neuropatía axonal motora aguda (AMAN)

Tipo de autoanticuerpo	Autoanticuerpo	Autoantígeno	Enfermedad o trastorno autoinmunitario
		Gangliósido GM1	Neuropatía motora multifocal con bloqueo de la conducción (MMN)
Anticuerpos anti-actina		Actina	Anticuerpos anti-actina de enfermedad celíaca correlacionados con el nivel de daño intestinal [6] [7]
Anticuerpo microsómico tipo 1 de hígado y riñón			Hepatitis autoinmunitaria. [8]
Anticoagulante lúpico	Anticuerpos antitrombina	Trombina	Lupus eritematoso sistémico
Anticuerpo citoplasmático antineutrófilos		Fosfolípido	Síndrome antifosfolípido
	c-ANCA	Proteínas en el citoplasma de neutrófilos	Granulomatosis de Wegener
	p-ANCA	Neutrófilo perinuclear	Poliangeítis microscópica, síndrome de Churg-Strauss, vasculitis sistémicas (inespecíficas)
Factor reumatoide		IgG	Artritis reumatoide
Anticuerpo antimúsculo liso		Músculo liso	Hepatitis autoinmunitaria crónica
Anticuerpo antimitocondrial		Mitocondrias	Cirrosis biliar primaria[9]
Anti-SRP		Partícula de reconocimiento de señales	Polimiositis[10]
		Complejo de exosomas	Escleromiositis
		Receptor nicotínico de acetilcolina	Miastenia gravis
		Quinasa específica de músculo (MUSK)	Miastenia gravis
Anti-VGCC		Canal de calcio dependiente de voltaje (tipo P/Q)	Síndrome miasténico de Lambert-Eaton
		Peroxidasa tiroidea (microsómica)	Tiroiditis de Hashimoto
		Receptor de TSH	Enfermedad de Graves
		Hu	Síndrome cerebeloso paraneoplásico
		Yo (células de Purkinje cerebelosas)	Síndrome cerebeloso paraneoplásico
		Anfifisina	Síndrome de la persona rígida, síndrome cerebeloso paraneoplásico
Anti-VGKC		Canal de potasio dependiente de voltaje (VGKC)	Encefalitis límbica, síndrome de Isaac (neuromiotónica autoinmunitaria)
		Neuronas de los ganglios basales	Corea de Sydenham, enfermedad neuropsiquiátrica autoinmunitaria pediátrica asociada con Streptococcus (PANDAS)
		Receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA)	Encefalitis
		Ácido glutámico descarboxilasa (GAD)	Diabetes mellitus tipo 1, síndrome de la persona rígida

Tipo de autoanticuerpo	Autoanticuerpo	Autoantígeno	Enfermedad o trastorno autoinmunitario
		Acuaporina-4	Neuromielitis óptica (síndrome de Devic)

Los antígenos endógenos también pueden incluir los asociados con tejido trasplantado, tales como trasplante de órgano sólido o trasplante de médula ósea. La enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) es una complicación que puede producirse después de un trasplante de células pluripotentes (por ejemplo, células madre) o de médula ósea, en el que el material recién trasplantado ataca el cuerpo del receptor del trasplante. En algunos casos, la GVHD se produce después de una transfusión de sangre.

Los antígenos endógenos adicionales comprenden antígenos asociados con enfermedades inflamatorias. Dichos antígenos incluyen, pero sin limitación, aquellos asociados con la enfermedad de Alzheimer, artritis, asma, aterosclerosis, enfermedad de Crohn, colitis, fibrosis quística, dermatitis, diverticulitis, hepatitis, síndrome del intestino irritable (IBS), lupus eritematoso, distrofia muscular, nefritis, Parkinson, herpes y colitis ulcerosa. Los antígenos asociados a enfermedades inflamatorias también incluyen, por ejemplo, los asociados con enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), bronquiectasia, colecistitis crónica, tuberculosis, tiroiditis de Hashimoto, sarcoidosis, silicosis.

En algunos casos, los antígenos endógenos pueden ser los asociados con la enfermedad inflamatoria del intestino no autoinmunitaria, adherencias posquirúrgicas, enfermedad de la arteria coronaria, fibrosis hepática, síndrome de dificultad respiratoria aguda, pancreatitis inflamatoria aguda, pancreatitis inducida por colangiopancreatografía retrógrada endoscópica, quemaduras, aterogénesis de arterias coronarias, cerebrales y periféricas, apendicitis, colecistitis, diverticulitis, trastornos fibróticos viscerales, cicatrización de heridas, trastornos de la cicatrización de la piel (queloides, hidradenitis supurativa), trastornos granulomatosos (sarcoidosis, cirrosis biliar primaria), asma, pioderma gangrenoso, síndrome de Sweet, enfermedad de Behcet o colangitis esclerosante primaria.

Inmunomoduladores

Inmunomoduladores exógenos

Los inmunomoduladores exógenos incluyen, pero sin limitación, estatinas; inhibidores de mTOR, tales como rapamicina o un análogo de rapamicina; agentes de señalización de TGF- β ; agonistas del receptor de TGF- β ; inhibidores de histona desacetilasa (HDAC); corticosteroides; inhibidores de la función mitocondrial, tales como rotenona; inhibidores de P38; inhibidores de NF- κ B, ligandos del receptor de lectina (por ejemplo, CD22); agonistas del receptor de adenosina; agonistas de prostaglandina E2; inhibidores de fosfodiesterasa, tales como inhibidor de fosfodiesterasa 4; inhibidores del proteasoma; inhibidores de quinasas; agonistas del receptor acoplado a proteína G; antagonistas del receptor acoplado a proteína G; glucocorticoides; retinoides; inhibidores de citoquinas; inhibidores del receptor de citoquinas; activadores del receptor de citoquinas; antagonistas del receptor activado por el proliferador de peroxisomas; agonistas del receptor activado por el proliferador de peroxisomas; inhibidores de histona desacetilasa; inhibidores de calcineurina; inhibidores de fosfatasa y ATP oxidados. Los inmunomoduladores también incluyen IDO, vitamina D3, ciclosporina A, inhibidores del receptor de hidrocarburos de arilo, resveratrol, azatiopurina, 6-mercaptopurina, aspirina, ácido niflúmico, estriol, tripolida, interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-10), ciclosporina A, ARNpi dirigidos a citoquinas o receptores de citoquinas.

Los ejemplos de estatinas incluyen atorvastatina (LIPITOR[®], TORVAST[®]), cerivastatina, fluvastatina (LESCOL[®], LESCOL[®] XL), lovastatina (MEVACOR[®], ALTOCOR[®], ALTOPREV[®]), mevastatina (COMPACTIN[®]), pitavastatina (LIVALO[®], PIAVA[®]), rosuvastatina (PRAVACHOL[®], SELEKTINE[®], LIPOSTAT[®]), rosuvastatina (CRESTOR[®]) y simvastatina (ZOCOR[®], LIPEX[®]).

Los ejemplos de inhibidores de mTOR incluyen rapamicina y análogos de la misma (por ejemplo, CCL-779, RAD001, AP23573, C20-metalilrapamicina (C20-Marap), C16-(S)-butilsulfonamidrapamicina (C16-BSrap), C16-(S)-3-metilindolrapamicina (C16-IRap) (Bayle et al. Chemistry & Biology 2006, 13:99-107)), AZD8055, BEZ235 (NVP-BEZ235), ácido crisofánico (crisofanol), deforolimus (MK-8669), everolimus (RAD0001), KU-0063794, PI-103, PP242, temsirolimus y WYE-354 (disponibles de Selleck, Houston, TX, Estados Unidos).

Los ejemplos de agentes de señalización de TGF- β incluyen ligandos de TGF- β (por ejemplo, activina A, GDF1, GDF11, proteínas morfogénicas óseas, nodal, TGF- β) y sus receptores (por ejemplo, ACVR1B, ACVR1C, ACVR2A, ACVR2B, BMPR2, BMPR1A, BMPR1B, TGF β RI, TGF β RII), R-SMADS/co-SMADS (por ejemplo, SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD5, SMAD8) e inhibidores de ligandos (por ejemplo, folistatina, nogina, cordina, DAN, lefty, LTBP1, THBS1, Decorina).

Los ejemplos de inhibidores de la función mitocondrial incluyen atractilósido (sal dipotásica), ácido bongkreico (sal de triamonio), cianuro de carbonilo m-clorofenilhidrazona, carboxiatractilósido (por ejemplo, de *Atractylis gummifera*), CGP-37157, (-)-Deguelina (por ejemplo, de *Mundulea sericea*), F16, péptido del dominio de unión a VDAC de

hexoquinasa II, oligomicina, rotenona, Ru360, SFK1 y valinomicina (por ejemplo, de *Streptomyces fulvissimus*) (EMD4Biosciences, Estados Unidos).

Los ejemplos de inhibidores de P38 incluyen SB-203580 (4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)1H-imidazol), SB-239063 (trans-1-(4-hidroxiciclohexil)-4-(fluorofenil)-5-(2-metoxi-pirimidin-4-il)imidazol), SB-220025 (5-(2-amino-4-pirimidinil)-4-(4-fluorofenil)-1-(4-piperidinil)imidazol) y ARRY-797.

Los ejemplos de inhibidores de NF (por ejemplo, NK- κ B) incluyen IFRD1, 2-(1,8-naftiridin-2-il)fenol, ácido 5-aminosalicílico, BAY 11-7082, BAY 11-7085, CAPE (Éster fenético del ácido cafeico), maleato de dietilo, inhibidor IV de IKK-2, IMD 0354, lactacistina, MG-132 [Z-Leu-Leu-Leu-CHO], inhibidor III de la activación de NF- κ B, inhibidor de la activación II de NF- κ B, JSH-23, partenólido, óxido de fenilarsina (PAO), PPM-18, sal de amonio del ácido pirrolidinditiocarbámico, QNZ, RO 106-9920, rocaglamida, rocaglamida AL, rocaglamida C, rocaglamida I, rocaglamida J, rocaglaol, (R)-MG-132, salicilato de sodio, triptolida (PG490), wedelolactona.

Los ejemplos de ligandos del receptor de lectina incluyen ligandos de CD22, tales como los 9-azido-9-desoxisialiloligosacáridos y otros ligandos de CD22 divulgados en B. E. Collins et. al. "High-Affinity Ligand Probes of CD22 Overcome the Threshold Set by cis Ligands to Allow for Binding, Endocytosis, and Killing of B Cells" J. Immunol 1 de septiembre, 2006 vol. 177 N° 5 2994-3003; y los ligandos divulgados en G-J Boons, "Liposomes Modified by Carbohydrate Ligands can Target B cells for the Treatment of B-Cell Lymphomas" Expert Rev Vaccines. Noviembre de 2010; 9(11): 1251-1256).

Los ejemplos de agonistas del receptor de adenosina incluyen CGS-21680 y ATL-146e.

Los ejemplos de agonistas de prostaglandina E2 incluyen E-Prostanoide 2 y E-Prostanoide 4.

Los ejemplos de inhibidores de fosfodiesterasa (inhibidores no selectivos y selectivos) incluyen cafeína, aminofilina, IBMX (3-isobutil-1-metilxantina), paraxantina, pentoxifilina, teobromina, teofilina, xantinas metiladas, vinpocetina, EHNA (eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina), anagrelida, enoximona (PERFANTM), milrinona, levosimendón, mesembrina, ibudilast, piclamilast, luteolina, drotaverina, roflumilast (DAXASTM, DALIRESPTM), sildenafil (REVATION[®], VIAGRA[®]), tadalafil (ADCIRCA[®], CIALIS[®]), vardenafilo (LEVITRA[®], STAXYN[®]), udenafilo, avanafilo, icariina, 4-metilpiperazina y pirazolo pirimidina-7-1.

Los ejemplos de inhibidores del proteasoma incluyen bortezomib, disulfiram, epigallocatequina-3-galato y salinosporamida A.

Los ejemplos de inhibidores de quinasas incluyen bevacizumab, BIBW 2992, cetuximab (ERBITUX[®]), imatinib (GLEEVEC[®]), trastuzumab (HERCEPTIN[®]), gefitinib (IRESSA[®]), ranibizumab (LUCENTIS[®]), pegaptanib, sorafenib, dasatinib, sunitinib, erlotinib, nilotinib, lapatinib, panitumumab, vandetanib, E7080, pazopanib, mubritinib.

Los ejemplos de glucocorticoides incluyen hidrocortisona (cortisol), acetato de cortisona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona, betametasona, triamcinolona, beclometasona, acetato de fludrocortisona, acetato de desoxicorticosterona (DOCA) y aldosterona.

Los ejemplos de retinoides incluyen retinol, retinal, tretinoína (ácido retinoico, RETIN-A[®]), isotretinoína (AC CUTANE[®], AMNESTEEM[®], CLARAVIS[®], SOTRET[®]), alitretinoína (PANRETIN[®]), etretinato (TEGISONTM) y su metabolito acitretina (SORIATANE[®]), tazaroteno (TAZORAC[®], AVAGE[®], ZORAC[®]), bexaroteno (TARGRETIN[®]) y adapaleno (DIFFERIN[®]).

Los ejemplos de inhibidores de citoquinas incluyen IL1ra, antagonista del receptor de IL1, IGF1R, TNF-BF, uromodulina, alfa-2-macroglobulina, ciclosporina A, pentamidina y pentoxifilina (PENTOPAK[®], PENTOXIL[®], TRENTAL[®]).

Los ejemplos de antagonistas de receptores activados por el proliferador de peroxisomas incluyen GW9662, antagonista III de PPARy, G335, T0070907 (EMD4Biosciences, Estados Unidos).

Los ejemplos de agonistas del receptor activado por el proliferador de peroxisomas incluyen pioglitazona, ciglitazona, clofibrato, GW1929, GW7647, L-165,041, IY 171883, activador PPARy, Fmoc-Leu, troglitazona y WY-14643 (EMD4Biosciences, Estados Unidos).

Los ejemplos de inhibidores de histona desacetilasa incluyen ácidos hidroxámicos (o hidroxamatos), tales como tricostatina A, tetrapéptidos cíclicos (tales como trapoxina B) y depsipéptidos, benzamidas, cetonas electrofílicas, compuestos de ácido alifático, tales como fenilbutirato y ácido valproico, ácidos hidroxámicos, tales como vorinostat (SAHA), belinostat (PXD101), LAQ824 y panobinostat (LBH589), benzamidas, tales como entinostat (MS-275), C1994 y mocetinostat (MGCD0103), nicotinamida, derivados de NAD, dihidrocinarina, naftopirana y 2-hidroxinafaldehídos.

Los ejemplos de inhibidores de calcineurina incluyen ciclosporina, pimecrolimus, voclosporina y tacrolimus.

Los ejemplos de inhibidores de fosfatasa incluyen clorhidrato de BN82002, CP-91149, caliculina A, ácido cantaridico, cantaridina, cipermetrina, etil-3,4-defostatina, sal sódica de fostriecina, MAZ51, metil-3,4-defostatina, NSC 95397, norcantaridina, sal de amonio del ácido okadaico de prorocentrum concavum, ácido okadaico, sal potásica del ácido okadaico, sal sódica del ácido okadaico, óxido de fenilarsina, diversos cócteles inhibidores de fosfatasa, proteína fosfatasa 1C, proteína inhibidora de la proteína fosfatasa 2A, proteína fosfatasa 2A1 sódica, ortovanadato de proteína fosfatasa 2A2.

Inmunomoduladores endógenos

En determinados casos, los inmunomoduladores están disponibles de forma endógena. Los inmunomoduladores endógenos se generan por el propio organismo del sujeto, pero no se administran de forma repetida como parte del inmunoterapéutico específico de antígeno o como parte de alguna otra intervención terapéutica. Los ejemplos de inmunomoduladores endógenos comprenden sustancias y/o combinaciones de sustancias implicadas en la apoptosis o señalización relacionada, sustancias y/o combinaciones de sustancias implicadas en la biología de células T o B, y sustancias y/o combinaciones de sustancias implicadas en la biología de células dendríticas. En tales casos, el suministro del antígeno por medio de la administración repetida del inmunoterapéutico específico de antígeno puede iniciar, o mantener, un proceso tolerogénico específico del antígeno de interés.

Los ejemplos específicos de inmunomoduladores endógenos incluyen eritrocitos apoptóticos (divulgados por S. Kontos et al, "Engineering antigens for in situ erythrocyte binding induces T-cell deletion" Proc Natl Acad Sci USA 2 de enero de 2013; 110(1):E60-8); combinaciones de citoquinas particulares generadas cuando el antígeno está presente sin administrar también moléculas implicadas en la estimulación de células inmunitarias (por ejemplo, MHC I/II o moléculas coestimuladoras) o sin permitir que las células inmunitarias (tales como las células T, particularmente las células T vírgenes) adquieran la función efectora (divulgadas en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 2012/0076831 por Miller et al.); y combinaciones de citoquinas generadas cuando el antígeno está presente en un complejo de MHC-antígeno que induce la proliferación de células T tolerogénicas específicas de antígeno (divulgadas en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 2009/0155292 por Santamaria et. al.).

En algunos casos, se puede aislar un componente de un inmunoterapéutico específico de antígeno, tal como un antígeno o inmunomodulador. Aislar se refiere a separar el elemento de su entorno nativo, estando presente en cantidades suficientes para permitir su identificación o uso. Esto significa, por ejemplo, que el elemento puede (i) producirse selectivamente mediante clonación de la expresión o (ii) purificarse mediante cromatografía o electroforesis. Los elementos aislados pueden ser sustancialmente puros, pero no es necesario que lo sean. Debido a que un elemento aislado se puede mezclar con un excipiente farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, el elemento puede comprender solo un pequeño porcentaje en peso de la preparación. No obstante, el elemento está aislado porque se ha separado de las sustancias con las que puede estar asociado en los sistemas vivos, es decir, aislado de otros lípidos o proteínas. Cualquiera de los elementos descritos en el presente documento puede aislarse e incluirse en las composiciones y/o el inmunoterapéutico específico de antígeno en forma aislada.

D. PROCEDIMIENTOS DE FABRICACIÓN Y USO DE LAS COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS RELACIONADOS

Los inmunoterapéuticos específicos de antígeno se pueden preparar de diversas formas, dependiendo de la naturaleza de la composición. Se pueden conocer en la técnica elementos específicos de este tipo de preparaciones. Se presentan a continuación procedimientos de preparación para determinados casos preferidos de los inmunoterapéuticos específicos de antígeno enumerados; otros procedimientos de preparación para otros casos se pueden encontrar en la literatura relevante.

Los nanovehículos sintéticos, útiles en diversas formas de realización de la presente invención, se pueden preparar utilizando una amplia diversidad de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los nanovehículos sintéticos se pueden formar mediante procedimientos tales como nanoprecipitación, enfoque de flujo usando canales fluidicos, secado por pulverización, evaporación de disolvente de emulsión simple y doble, extracción de disolvente, separación de fases, molienda, procedimientos de microemulsión, microfabricación, nanofabricación, capas de sacrificio, coacervación simple y compleja, y otros procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. Como alternativa o adicionalmente, se han descrito síntesis en disolventes acuosos y orgánicos para nanomateriales monodispersos semiconductores, conductores, magnéticos, orgánicos y otros nanomateriales (Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545; y Trindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843). Se han descrito procedimientos adicionales en la literatura (véase, por ejemplo, Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275; y Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755; patentes de Estados Unidos 5578325 y 6007845; P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)).

Diversos materiales se pueden encapsular en nanovehículos sintéticos según sea conveniente usando una diversidad de procedimientos que incluyen, pero sin limitación, C. Astete et al., "Synthesis and characterization of PLGA

nanoparticles" J. Biomater. Sci. Sci. Polymer Edn, Vol. 17, N° 3, páginas 247-289 (2006); K. Avgoustakis "Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery" Current Drug Delivery 1:321-333 (2004); C. Reis et al., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles" Nanomedicine 2:8- 21 (2006); P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010). Se pueden utilizar otros procedimientos adecuados para encapsular materiales en nanovehículos sintéticos, incluidos, sin limitación, los procedimientos divulgados en la patente de Estados Unidos 6.632.671 por Unger, 14 de octubre de 2003.

En determinados casos, los nanovehículos sintéticos se preparan mediante un proceso de nanoprecipitación o secado por pulverización. Las condiciones usadas en la preparación de nanovehículos sintéticos se pueden alterar para producir partículas de un tamaño o propiedad deseados (por ejemplo, hidrofobicidad, hidrofiliidad, morfología externa, "pegajosidad", forma, etc.). El procedimiento de preparación de los nanovehículos sintéticos y las condiciones (por ejemplo, disolvente, temperatura, concentración, caudal de aire, etc.) utilizados pueden depender de los materiales que se van a acoplar a los nanovehículos sintéticos y/o la composición de la matriz polimérica.

Si los nanovehículos sintéticos preparados por cualquiera de los procedimientos anteriores tienen un intervalo de tamaños fuera del intervalo deseado, tales nanovehículos sintéticos se pueden ajustar en tamaño, por ejemplo usando un tamiz.

Pueden acoplarse elementos (es decir, componentes) de los nanovehículos sintéticos (tales como restos de los cuales se compone una superficie inmunoactiva, restos de direccionamiento, matrices poliméricas, antígenos e inmunomoduladores) al nanovehículo sintético general, por ejemplo, por medio de uno o más enlaces covalentes, o pueden acoplarse mediante uno o más enlazadores. Pueden adaptarse procedimientos adicionales de funcionalización de nanovehículos sintéticos de la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 2006/0002852 por Saltzman et al., la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 2009/0028910 por DeSimone et al., o la solicitud de patente internacional publicada WO/2008/127532 A1 por Murthy et al.

Como alternativa o adicionalmente, los nanovehículos sintéticos pueden acoplarse a componentes, tales como inmunomoduladores o antígenos, directamente o indirectamente por medio de interacciones no covalentes. En casos no covalentes, el acoplamiento no covalente está mediado por interacciones no covalentes, incluidas, pero sin limitación, interacciones de carga, interacciones de afinidad, coordinación de metales, adsorción física, interacciones anfitrión-huésped, interacciones hidrófobas, interacciones de apilamiento TT, interacciones de enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo y/o combinaciones de las mismas. Dichos acoplamientos pueden disponerse de forma que se encuentren en una superficie externa o en una superficie interna de un nanovehículo sintético. En algunos casos, la encapsulación y/o la absorción es una forma de acoplamiento. En algunos casos, los nanovehículos sintéticos descritos se pueden combinar con un antígeno mezclándolos en el mismo vehículo o sistema de administración. Se pueden producir formas de dosificación farmacéuticas de nanovehículos sintéticos utilizando procedimientos farmacéuticos tradicionales.

Se pueden preparar antígenos modificados o expresados de acuerdo con las referencias citadas en otra parte del presente documento. En particular, los constructos de fusión para antígenos modificados pueden prepararse utilizando técnicas de producción de proteínas convencionales, tal como se divulga por Kontos. Los antígenos expresados se pueden preparar utilizando una diversidad de técnicas, dependiendo de cómo se ha de administrar el material de nucleótidos que servirá como plantilla para la expresión de proteínas. Por ejemplo, se pueden encontrar técnicas para la administración de material nucleotídico dependiendo de la forma de administración/dosificación del material (por ejemplo, ADN/ARN desnudo, administración liposómica, pistola génica, etc.).

Las composiciones y/o los inmunoterapéuticos específicos de antígeno típicos pueden comprender tampones inorgánicos u orgánicos (por ejemplo, sales de sodio o potasio de fosfato, carbonato, acetato o citrato) y agentes de ajuste de pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o de potasio, sales de citrato o acetato, aminoácidos y sus sales) antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, alfa-tocoferol), tensioactivos (por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80, polioxietilen9-10 nonil fenol, desoxicolato de sodio), solución y/o crio/lío-estabilizadores (por ejemplo, sacarosa, lactosa, manitol, trehalosa), agentes de ajuste osmótico (por ejemplo, sales o azúcares), agentes antibacterianos (por ejemplo, ácido benzoico, fenol, gentamicina), agentes antiespumantes (por ejemplo, polidimetilsilozona), conservantes (por ejemplo, timerosal, 2-fenoxietanol, EDTA), estabilizadores poliméricos y agentes de ajuste de la viscosidad (por ejemplo, polivinilpirrolidona, poloxámero 488, carboximetilcelulosa) y codisolventes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicol, etanol).

Las composiciones y/o inmunoterapéuticos específicos de antígeno se pueden formular de forma que comprendan excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones y/o inmunoterapéuticos específicos de antígeno se pueden preparar usando técnicas de fabricación y composición farmacéuticas convencionales para obtener formas farmacéuticas útiles. Las técnicas adecuadas para su uso en la puesta en práctica de la presente invención se pueden encontrar en Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice, editado por Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-Obeng, y Suzanne M. Kresta, 2004 John Wiley & Sons, Inc.; y Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design, 2ª ed.

Editado por M. E. Auten, 2001, Churchill Livingstone. En un caso, los nanovehículos sintéticos se suspenden en una solución salina estéril para inyección junto con un conservante.

Debe entenderse que las composiciones y/o inmunoterapéuticos específicos de antígeno se pueden preparar de cualquier forma adecuada, y la invención no se limita de ninguna manera a las composiciones y/o inmunoterapéuticos específicos de antígeno que se pueden producir usando los procedimientos descritos en el presente documento. La selección de un procedimiento apropiado puede requerir atención a las propiedades de los restos particulares asociados.

En algunos casos, las composiciones y/o inmunoterapéuticos específicos de antígeno se fabrican en condiciones estériles o se esterilizan terminalmente. Esto puede garantizar que las composiciones y/o los inmunoterapéuticos específicos de antígeno resultantes sean estériles y no infecciosos, mejorando así la seguridad cuando se comparan con composiciones y/o inmunoterapéuticos específicos de antígeno no estériles. Esto proporciona una valiosa medida de seguridad, especialmente cuando los sujetos que reciben composiciones y/o inmunoterapéuticos específicos de antígeno tienen defectos inmunitarios, padecen una infección y/o son susceptibles de una infección. En algunos casos, las composiciones y/o los inmunoterapéuticos específicos de antígeno pueden liofilizarse y almacenarse en suspensión o como polvo liofilizado dependiendo de la estrategia de formulación durante periodos prolongados sin perder actividad.

Administración

Las composiciones de la invención, incluido el inmunoterapéutico específico de antígeno según sea apropiado, se pueden administrar por una diversidad de vías, incluidas, pero sin limitación, subcutánea, intranasal, oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, transmucosa, transmucosa, sublingual, rectal, oftálmica, pulmonar, intradérmica, transdérmica, transcutánea o intradérmica, o mediante una combinación de estas vías. Las vías de administración también incluyen la administración por inhalación o aerosol pulmonar. Las técnicas para preparar sistemas de administración en aerosol son bien conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sciarra y Cutie, "Aerosols", en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, 1990, páginas 1694-1712).

Las composiciones y/o los inmunoterapéuticos específicos de antígeno de la invención se pueden administrar en cantidades eficaces, tales como las cantidades eficaces descritas en otra parte del presente documento. Las dosis de las composiciones y/o inmunoterapéuticos específicos de antígeno pueden contener cantidades variables de inmunomoduladores y/o antígenos. La cantidad de inmunomoduladores y/o antígenos presentes en las composiciones y/o inmunoterapéuticos específicos de antígeno puede variarse de acuerdo con la naturaleza de los antígenos y/o inmunomoduladores, el beneficio terapéutico que se va a lograr y otros parámetros de este tipo. En algunos casos, se pueden realizar estudios de intervalos de dosis para establecer la cantidad terapéutica óptima de inmunomoduladores y/o antígenos que deben estar presentes en las composiciones y/o inmunoterapéuticos específicos de antígeno. En algunos casos, los inmunomoduladores y/o antígenos están presentes en las composiciones y/o inmunoterapéuticos específicos de antígeno en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmunitaria tolerogénica a antígenos de interés tras la administración a un sujeto.

Administración repetida

Las composiciones y los procedimientos descritos en el presente documento pueden utilizarse para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria tolerogénica y/o para suprimir, modular, dirigir o redirigir una respuesta inmunitaria no deseada.

"Administración repetida" o "administrar de forma repetida" o "administrando de forma repetida" y similares significa potenciar o prolongar la persistencia de una tolerancia inmunitaria previamente establecida o un efecto que es característico de la tolerancia. La administración repetida puede implicar una administración o un ciclo corto de tratamiento en un punto temporal en el que la tolerancia establecida está disminuyendo o corre el riesgo de disminuir. La administración repetida comienza con la siguiente dosis o las siguientes dosis del terapéutico específico de antígeno administrado después de la administración de una dosis inicial de un inmunoterapéutico específico de antígeno. El inmunoterapéutico específico de antígeno inicial que se administra puede ser el mismo o diferente (en términos de composición, dosificación, etc.) del inmunoterapéutico específico de antígeno que se administra durante la administración repetida. La dosificación repetida se realiza preferentemente de 1 semana a 10 años, y de forma más preferida de 1 a 12 meses después de una dosis inicial del terapéutico específico de antígeno o una administración repetida previa. La aplicación de la invención puede implicar administraciones repetidas regulares en un programa de administraciones que se realizan bisemanalmente, semanalmente, quincenalmente o en cualquier otro programa regular.

Las composiciones y/o los inmunoterapéuticos específicos de antígeno se pueden administrar en una diversidad de frecuencias. En un caso preferido, al menos una administración de las composiciones y/o inmunoterapéuticos específicos de antígeno dentro de una administración repetida son suficientes para generar una respuesta farmacológicamente relevante. En casos más preferidos, se utilizan al menos dos administraciones, al menos tres

administraciones, o al menos cuatro administraciones de las composiciones y/o inmunoterapéuticos específicos de antígeno para asegurar una respuesta farmacológicamente relevante dentro de la administración repetida general.

La administración profiláctica repetida de las composiciones y/o los inmunoterapéuticos específicos de antígeno se puede iniciar antes de la aparición de la enfermedad, trastorno o afección o la administración repetida terapéutica se puede iniciar después de establecer un trastorno, un trastorno o una afección.

En algunos casos, la administración de un inmunomodulador se lleva a cabo, por ejemplo, antes de la administración de un antígeno exógeno. En casos ilustrativos, los inmunomoduladores se administran en uno o más puntos temporales, incluidos, pero sin limitación, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 días antes de la administración de un antígeno exógeno. Además, o alternativamente, se pueden administrar inmunomoduladores a un sujeto después de la administración del antígeno exógeno. En casos ilustrativos, los inmunomoduladores se administran en uno o más puntos temporales, incluidos, pero sin limitación, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, etc. días después de la administración de un antígeno exógeno.

Demostración de protocolos y elementos de los mismos

Los protocolos y elementos que componen los protocolos se pueden demostrar en sujetos humanos o no humanos. En los casos en los que los protocolos se demuestran en sujetos no humanos, dichos protocolos o elementos de los mismos pueden traducirse en protocolos humanos. Por ejemplo, los resultados de los ensayos de los protocolos llevados a cabo en roedores o primates no humanos pueden sugerir elementos del protocolo tales como la frecuencia de dosificación repetida, las cantidades de dosis del inmunoterapéutico específico del antígeno, el número de administraciones del inmunoterapéutico específico del antígeno en cada caso de dosificación repetida, vías de administración y variaciones de los elementos anteriores dentro de cada uno de los protocolos. En un caso, los resultados del protocolo de roedores y/o primates no humanos pueden sugerir una cantidad de dosis (incluidas las dosis máxima y mínima que definen una ventana terapéutica) que después se escala para su uso en un protocolo humano, basándose en las técnicas de escalado habituales, tales como escalado alimétrico. Los elementos de protocolo no humanos también pueden sugerir la frecuencia óptima de la dosificación repetida que se puede traducir a protocolos humanos; en los que determinados casos tienen aproximadamente la misma frecuencia, y otros casos tienen una frecuencia ajustada basada en diferencias entre las especies no humanas y los seres humanos.

Dichos protocolos no humanos, o elementos de protocolo, se pueden seleccionar basándose en los resultados que mostraron la no inducción de inmunosupresión tras la administración repetida. Dichos protocolos no humanos, o elementos de los mismos, pueden traducirse para su uso en seres humanos, para proporcionar un beneficio esperado de seguridad (y posiblemente eficacia) en seres humanos cuando las composiciones y/o los inmunoterapéuticos específicos de antígeno se administran de forma repetida. Los protocolos no humanos, o elementos de los mismos, se pueden traducir en protocolos humanos, o elementos de los mismos, utilizando las técnicas y consideraciones indicadas anteriormente, en otra parte del presente documento y, en general, en la técnica.

Otro aspecto de la descripción se refiere a kits. En algunos casos, el kit comprende una dosis o más de una dosis de un inmunoterapéutico específico de antígeno tal como se describe en el presente documento. En tales casos, el kit comprende más de una dosis de un inmunomodulador. El kit también puede comprender o comprende además más de una dosis de un antígeno. Las dosis de inmunomodulador y/o antígeno pueden estar contenidas en recipientes separados o dentro del mismo recipiente del kit. En algunos casos, el recipiente es un vial o una ampolla. En algunos casos, las dosis de inmunomodulador y/o antígeno están contenidas dentro de una solución separada de los recipientes, de modo que las dosis se pueden añadir al recipiente en un punto temporal posterior. En algunos casos, las dosis de inmunomodulador y/o antígeno se encuentran en forma liofilizada cada una en un recipiente separado o en el mismo recipiente, de manera que puedan reconstituirse en un punto temporal posterior. En algunos casos, el kit comprende, además, instrucciones para la reconstitución, mezcla, administración, etc. En algunos casos, las instrucciones incluyen una descripción de los procedimientos descritos en el presente documento. Las instrucciones pueden estar en cualquier forma adecuada, por ejemplo, como un inserto impreso o una etiqueta. En algunos casos, el kit comprende además una o más jeringas.

EJEMPLOS

Los ejemplos siguientes contienen ejemplos de referencia, que ilustran una serie de otros desarrollos y desarrollos adicionales que se divulgan en la divulgación técnica de referencia anterior y la divulgación detallada, pero que no se presentan o se reivindican como la invención como tal, que se define exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Demostración de un protocolo no inmunosupresor que utiliza inmunoterapéutico específico de antígeno que se administra de forma repetida

Materiales de nanovehículos sintéticos

Se adquirió rapamicina de TSZ CHEM (185 Wilson Street, Framingham, MA 01702; producto con el N° de catálogo R1017). Se adquirió PLGA de aproximadamente 25.000 Da de Lakeshore Biochemicals (756 Tom Martin Dr

Birmingham, AL 35211). Código de producto 5050 DLG 2.5A. El copolímero de bloques PLA-PEG-OMe con un bloque de PEG terminado en metil éter de aproximadamente 5.000 Da y un bloque de PLA de 48.000 Da se adquirió de Lakeshore Biochemicals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211). Código de producto 100 DL mPEG 5000 5CE. OP11.323 se adquirió de BACHEM (3132 Kashiwa Street, Torrance, CA 90505; Número de lote B06481). El poli(alcohol vinílico) EMPROVE® 4-88, USP (hidrolizado al 85-89%, viscosidad de 3,4-4,6 mPa·s) se adquirió de EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027). Número de parte 1.41354.

Procedimiento del nanovehículo sintético

Las soluciones se prepararon de la forma siguiente: Solución 1: PLGA a 100 mg/ml en cloruro de metileno. La solución se preparó disolviendo PLGA en cloruro de metileno puro. Solución 2: PLA-PEG a 100 mg/ml en cloruro de metileno. La solución se preparó disolviendo PLA-PEG en cloruro de metileno puro. Solución 3: Rapamicina a 50 mg/ml en cloruro de metileno. La solución se preparó disolviendo rapamicina en cloruro de metileno puro. Solución 4: OP11.323 a 20 mg/ml en HCl 0,13 M. La solución se preparó disolviendo OP11.323 en HCl 0,13 M. Solución 5: Poli(alcohol vinílico) a 50 mg/ml en tampón fosfato 100 mM pH 8. Solución 6: Tampón fosfato 70 mM, pH 8. En primer lugar se creó una emulsión primaria (W1/O) mezclando las soluciones 1 a 4. La solución 1 (0,75 ml), la solución 2 (0,25 ml), la solución 3 (0,20 ml) y la solución 4 (0,2 ml) se combinaron en un pequeño tubo de presión de vidrio y se sonicaron al 50% de amplitud durante 40 segundos utilizando un sonicador digital de Branson 250.

Después se formó una emulsión secundaria (W1/O/W2) mediante la adición de la solución 5 (3,0 ml) a la emulsión primaria, agitación en vórtice para crear una dispersión bruta y, a continuación, sonicación al 30% de amplitud durante 60 segundos utilizando el sonicador digital de Branson 250. La emulsión secundaria se añadió a un vaso de precipitados abierto de 50 ml que contenía la solución 6 (30 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que el diclorometano se evaporara y los nanovehículos se formaran en suspensión. A continuación, se lavó una parte de los nanovehículos suspendidos transfiriendo la suspensión de los nanovehículos a un tubo de centrífuga, centrifugando a 75.600 rcf durante 35 minutos, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en solución salina tamponada con fosfato. Se repitió este proceso de lavado y después se resuspendió el sedimento en PBS 1X para lograr una suspensión de nanovehículo que tenía una concentración nominal de 10 mg/ml sobre una base de polímero. La suspensión se almacenó congelada a -20 °C hasta su uso.

El tamaño de los nanovehículos se determinó por dispersión dinámica de la luz. La cantidad de rapamicina en el nanovehículo se determinó por análisis por HPLC. La cantidad de OP11.323 en el nanovehículo se determinó por análisis por HPLC. La masa total de nanovehículos secos por ml de suspensión se determinó mediante un procedimiento gravimétrico.

Diámetro eficaz (nm)	Agonista de TLR, % p/p	Antígeno, % p/p
211,6	Rapamicina, 8,63	Péptido OP11.323, 1,3

ELISA: Medición de IgG Anti-OVA

Se midió el nivel de anticuerpos IgG. Se usó caseína bloqueante en PBS (Thermo Fisher, N° de catálogo 37528) como diluyente. Se utilizó Tween-20 al 0,05% en PBS como tampón de lavado, preparado mediante la adición de 10 ml de Tween-20 ((Sigma, N° de catálogo P9416-100 mL) a 2 litros de una solución madre de PBS 10x (PBS: Concentrado líquido OmniPur® 10X PBS, 4 l, EMD Chemicals, N° de catálogo 6505) y 18 litros de agua desionizada.

Se utilizó proteína OVA a una concentración madre de 5 mg/ml como material de recubrimiento. Se utilizó una dilución 1:1000 a 5 µg/ml como concentración de trabajo. Cada uno de los pocillos de las placas de ensayo se recubrió con 100 µl de OVA diluido por pocillo, las placas se sellaron con una película selladora (VWR, N° de catálogo 60941 -120) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Se utilizaron placas de fondo plano de 96 pocillos Costar9017 como placas de ensayo, Costar9017.

Se utilizaron una placa de polipropileno de 96 pocillos o tubos de baja unión como placas de preparación, en las que se prepararon las muestras antes de transferirlas a la placa de ensayo. Las placas de preparación no contenían ningún antígeno y, por lo tanto, los anticuerpos del suero no se unieron a la placa durante la preparación de las muestras. Las placas de preparación se utilizaron para la preparación de muestras para minimizar la unión que podría producirse durante la preparación o el pipeteo de muestras si se utilizara una placa recubierta de antígeno para preparar las muestras. Antes de preparar las muestras en la placa de preparación, los pocillos se cubrieron con diluyente para bloquear cualquier unión no específica y la placa se selló y se incubó a 4 °C durante la noche.

Las placas de ensayo se lavaron tres veces con tampón de lavado, y el tampón de lavado se aspiró completamente de los pocillos después del último lavado. Después del lavado, se añadieron 300 µl de diluyente a cada uno de los pocillos de la o las placas de ensayo para bloquear la unión no específica y las placas se incubaron al menos 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras de suero se prepararon en la placa de preparación a las diluciones de partida apropiadas. A veces, las diluciones de partida también se prepararon en tubos de 1,5 ml utilizando diluyente. Las

diluciones de partida apropiadas se determinaron sobre la base de datos previos, cuando estaban disponibles. Cuando no se disponía de datos previos, la dilución de partida más baja fue 1:40. Una vez diluida, se transfirieron 200 µl de la dilución de partida de la muestra de suero al pocillo apropiado de la placa de preparación.

Una disposición ilustrativa de la placa de preparación se describe de la forma siguiente: Las columnas 2 y 11 contenían patrón de isotipo IgG2b anti-Ovoalbúmina monoclonal (AbCam, ab17291), diluido a 1 µg/ml (dilución 1:4000). Las columnas 3-10 contenían muestras de suero (en diluciones apropiadas). Las columnas 1 y 12 no se utilizaron para muestras o patrones para evitar cualquier sesgo de las mediciones debido al efecto de borde. En cambio, las columnas 1 y 12 contenían 200 µl de diluyente. Se utilizó suero de ratón normal diluido 1:40 como control negativo. Se utilizó IgG2a anti-ratón diluida 1:500 a partir de 0,5 mg/ml de material (BD Bioscience) como control de isotipo.

Una vez preparadas todas las muestras en la placa de preparación, la placa se selló y se almacenó a 4 °C hasta que el bloqueo de las placas de ensayo se hubo completado. Las placas de ensayo se lavaron tres veces con tampón de lavado y el tampón de lavado se aspiró por completo después del último lavado. Después del lavado, se añadieron 100 µl de diluyente a todos los pocillos de las filas B-H de las placas de ensayo. Se utilizó una pipeta de 12 canales para transferir muestras desde la placa de preparación a la placa de ensayo. Las muestras se mezclaron antes de la transferencia pipeteando 150 µl de suero diluido hacia arriba y hacia abajo 3 veces. Después de mezclar, se transfirieron 150 µl de cada una de las muestras de la placa de preparación y se añadieron a la fila A de la placa de ensayo respectiva.

Una vez se hubieron transferido las diluciones de partida de cada una de las muestras de la placa de preparación a la fila A de la placa de ensayo, se pipetearon diluciones en serie en la placa de ensayo de la forma siguiente: 50 µl de cada una de las muestras de suero se retiraron de la fila A utilizando una pipeta de 12 canales y se mezclaron con los 100 µl de diluyente previamente añadido a cada uno de los pocillos de la fila B. Esta etapa se repitió en toda la placa. Después de pipetear la dilución de la última fila, se retiraron 50 µl de fluido de los pocillos de la última fila y se desecharon, lo que dio como resultado un volumen final de 100 µl en cada uno de los pocillos de la placa de ensayo. Una vez preparadas las diluciones de la muestra en las placas de ensayo, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante al menos 2 horas.

Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. El anticuerpo de detección (anti-IgG anti-ratón de cabra, conjugado con HRP, AbCam ab98717) se diluyó 1: 1500 (0,33 µg/ml) en diluyente y se añadieron 100 µl del anticuerpo diluido a cada uno de los pocillos. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y después se lavaron tres veces con tampón de lavado, incluyendo cada etapa de lavado un tiempo de remojo de al menos 30 segundos.

Después del lavado, se añadió sustrato de detección a los pocillos. Se combinaron partes iguales de sustrato A y sustrato B (BD Biosciences TMB Substrate Reagent Set, N° de catálogo 555214) inmediatamente antes de la adición a las placas de ensayo, y se añadieron 100 µl de la solución de sustrato mixto a cada uno de los pocillos y se incubaron durante 10 minutos en la oscuridad. La reacción se detuvo añadiendo 50 µl de solución de detención (H₂SO₄ 2 N) a cada uno de los pocillos después del periodo de 10 minutos. La densidad óptica (DO) de los pocillos se evaluó inmediatamente después de añadir la solución de detención en un lector de placas a 450 nm con sustracción a 570 nm. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa informático SoftMax Pro v5.4 de Molecular Device. En algunos casos, se preparó un gráfico de ajuste de curva logística de cuatro parámetros con la dilución en el eje x (escala logarítmica) y el valor de DO en el eje y (escala lineal), y se determinó el valor semimáximo (CE50) para cada una de las muestras. La plantilla de la placa en la parte superior del diseño se ajustó para reflejar la dilución de cada una de las muestras (1 por columna).

ELISA: Medición de IgG anti-KLH

Se midió el nivel de anticuerpos IgG. Se usó caseína bloqueante en PBS (Thermo Fisher, N° de catálogo 37528) como diluyente. Se utilizó Tween-20 al 0,05% en PBS como tampón de lavado, preparado mediante la adición de 10 ml de Tween-20 ((Sigma, N° de catálogo P9416-100 ml) a 2 litros de una solución madre de PBS 10x (PBS: Concentrado líquido OmniPur® 10X PBS, 4 l, EMD Chemicals, N° de catálogo 6505) y 18 litros de agua desionizada.

Se utilizó proteína KLH (Sigma, N° de catálogo H7127) a una concentración madre de 10 mg/ml como material de recubrimiento. Se utilizó una dilución 1:2000 a 5 µg/ml como concentración de trabajo. Cada uno de los pocillo de las placas de ensayo se recubrió con 100 µl de KLH diluida por pocillo, las placas se sellaron con una película selladora (N° de catálogo de VWR 60941 -120) y se incubaron durante la noche a 4 °C.

Se utilizaron una placa de polipropileno de 96 pocillos o tubos de baja unión como placas de preparación, en las que se prepararon las muestras antes de transferirlas a la placa de ensayo. Las placas de preparación no contenían ningún antígeno y, por lo tanto, los anticuerpos del suero no se unieron a la placa durante la preparación de las muestras. Las placas de preparación se utilizaron para la preparación de muestras para minimizar la unión que podría producirse durante la preparación o el pipeteo de muestras si se utilizara una placa recubierta de antígeno para preparar las muestras. Antes de preparar las muestras en la placa de preparación, los pocillos se cubrieron con diluyente para bloquear cualquier unión no específica y la placa se selló y se incubó a 4 °C durante la noche.

Las placas de ensayo se lavaron tres veces con tampón de lavado, y el tampón de lavado se aspiró completamente de los pocillos después del último lavado. Después del lavado, se añadieron 300 µl de diluyente a cada uno de los pocillos de la o las placas de ensayo para bloquear la unión no específica y las placas se incubaron al menos 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras de suero se prepararon en la placa de preparación a las diluciones de partida apropiadas. A veces, las diluciones de partida también se prepararon en tubos de 1,5 ml utilizando diluyente. Las diluciones de partida apropiadas se determinaron sobre la base de datos previos, cuando estaban disponibles. Cuando no se disponía de datos previos, la dilución de partida más baja fue 1:40. Una vez diluida, se transfirieron 200 µl de la dilución de partida de la muestra de suero al pocillo apropiado de la placa de preparación.

Una disposición ilustrativa de la placa de preparación se describe de la forma siguiente: Las columnas 2 y 3 contenían patrón de isotipo IgG1 monoclonal de ratón anti-KLH (AbCam, ab34607), diluido a 0,2 µg/ml (dilución 1:5000 a partir de 1 mg/ml de solución madre). Las columnas 4-12 contenían muestras de suero (en diluciones apropiadas). La columna 1 no se utilizó para muestras o patrones, de modo que se pudo evaluar el efecto del diluyente solo sobre el material de recubrimiento. En cambio, la columna 1 contenía 200 µl de diluyente. Se utilizó suero de ratón normal diluido 1:40 como control negativo. Se utilizó IgG2a anti-ratón diluida 1:500 a partir de 0,5 mg/ml de material (BD Bioscience) como control de isotipo.

Una vez preparadas todas las muestras en la placa de preparación, la placa se selló y se almacenó a 4 °C hasta que el bloqueo de las placas de ensayo se hubo completado. Las placas de ensayo se lavaron tres veces con tampón de lavado y el tampón de lavado se aspiró por completo después del último lavado. Después del lavado, se añadieron 100 µl de diluyente a todos los pocillos de las filas B-H de las placas de ensayo. Se utilizó una pipeta de 12 canales para transferir muestras desde la placa de preparación a la placa de ensayo. Las muestras se mezclaron antes de la transferencia pipeteando 150 µl de suero diluido hacia arriba y hacia abajo 3 veces. Después de mezclar, se transfirieron 150 µl de cada una de las muestras de la placa de preparación y se añadieron a la fila A de la placa de ensayo respectiva.

Una vez se hubieron transferido las diluciones de partida de cada una de las muestras de la placa de preparación a la fila A de la placa de ensayo, se pipetearon diluciones en serie en la placa de ensayo de la forma siguiente: 50 µl de cada una de las muestras de suero se retiraron de la fila A utilizando una pipeta de 12 canales y se mezclaron con los 100 µl de diluyente previamente añadido a cada uno de los pocillos de la fila B. Esta etapa se repitió en toda la placa. Después de pipetear la dilución de la última fila, se retiraron 50 µl de fluido de los pocillos de la última fila y se desecharon, lo que dio como resultado un volumen final de 100 µl en cada uno de los pocillos de la placa de ensayo. Una vez que se prepararon las diluciones de la muestra en las placas de ensayo, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante al menos 2 horas.

Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. El anticuerpo de detección (anti-IgG anti-ratón de cabra, conjugado con HRP, AbCam ab98717) se diluyó 1: 1500 (0,33 µg/ml) en diluyente y se añadieron 100 µl del anticuerpo diluido a cada uno de los pocillos. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y después se lavaron tres veces con tampón de lavado, incluyendo cada etapa de lavado un tiempo de remojo de al menos 30 segundos.

Después del lavado, se añadió sustrato de detección a los pocillos. Se combinaron partes iguales de sustrato A y sustrato B (BD Biosciences TMB Substrate Reagent Set, N° de catálogo 555214) inmediatamente antes de la adición a las placas de ensayo, y se añadieron 100 µl de la solución de sustrato mixto a cada uno de los pocillos y se incubaron durante 10 minutos en la oscuridad. La reacción se detuvo añadiendo 50 µl de solución de detención (H₂SO₄ 2 N) a cada uno de los pocillos después del periodo de 10 minutos. La densidad óptica (DO) de los pocillos se evaluó inmediatamente después de añadir la solución de detención en un lector de placas a 450 nm con sustracción a 570 nm. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa informático SoftMax Pro v5.4 de Molecular Device. Se preparó un gráfico de ajuste de curva logística de cuatro parámetros con la dilución en el eje x (escala logarítmica) y el valor de DO en el eje y (escala lineal), y se determinó el valor semimáximo (CE50) para cada una de las muestras. La plantilla de la placa en la parte superior de la disposición se ajustó para reflejar la dilución de cada muestra (1 por columna).

Actividad tolerogénica específica de antígeno de inmunoterapéuticos específicos de antígeno bajo administración repetida

El propósito de este experimento fue evaluar el potencial para la inmunosupresión del efecto del protocolo de un inmunoterapéutico específico de antígeno administrado de forma repetida en las respuestas de anticuerpos nacientes mediante la medición de inmunoglobulinas específicas de antígeno. Un grupo de animales permaneció sin inmunizar como control. Todos los grupos de animales se inmunizaron con ovoalbúmina de pollo (OVA) y CpG con 3 inyecciones (tratamiento inicial el d0, d14 y d28) en las almohadillas de las patas delanteras y traseras derechas y con hemocianina de lapa californiana (KLH) en las almohadillas de las patas delanteras y traseras izquierdas. Se inyectaron inmunoterapéuticos específicos de antígeno (nanovehículos sintéticos producidos de acuerdo con los procedimientos anteriores, y etiquetados como "t²SVP") que contenían OPII el día 0 y después se administraron de forma repetida los días 14, 28, 42 y 56. Para la inmunización, los animales recibieron 20 µl/extremidad de OVA+CpG, 12,5 µg de OVA +

10 µg de CpG (KLH tal como se indica en la figura 1), se diluyeron t²SVP s.c. de ambas extremidades traseras de tal manera que se inyectaron las mismas cantidades de OVA₃₂₃₋₃₃₉ en los grupos tratados. Los resultados de la figura 1 muestran que, tras la administración repetida de un inmunoterapéutico específico de antígeno, los títulos contra OVA se ven muy afectados por el tratamiento con t²SVP (conjunto de cinco columnas de la izquierda) pero no los títulos anti KLH (conjunto de cinco columnas de la derecha). Para cada uno de los grupos de animales tratados de forma diferente, se muestran los títulos para los días 21,35, 49 y 63 (de izquierda a derecha). Por lo tanto, se demostró que el protocolo no induce inmunosupresión tras la administración repetida.

Protocolo de administración repetida de inmunoterapéutico específica de antígeno no inmunosupresor (profético)

En la puesta en práctica de la presente invención, este protocolo, o elementos del mismo, se utilizaría para generar un protocolo no inmunosupresor para su uso en otros sujetos. El elemento de la cantidad de dosis escalaría, por ejemplo, en seres humanos mediante el aumento de la dosis utilizando técnicas de escalado alimétricas para conservar aún la no inmunosupresión del protocolo subyacente establecido anteriormente.

Ejemplo 2: Nanovehículos sintéticos tolerogénicos acoplados a PLP que utilizan antígeno endógeno administrados de forma repetida (profético)

Se preparan nanovehículos sintéticos acoplados a PLP de acuerdo con los procedimientos expuestos en el ejemplo 21 de la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 2012/0076831 por Miller et. al. ("Miller"). Los nanovehículos sintéticos se administran inicialmente a ratones SJL por vía intravenosa a una dosis de 10 mg de nanovehículos/kg de peso corporal el día 0, y después se administran de forma repetida i.v. cada dos semanas durante 6 semanas después de la administración inicial. Se toman muestras de sangre el día 0, inmediatamente antes de cada una de las administraciones repetidas y una semana después de la administración repetida final.

Se analizan las muestras de sangre para establecer los títulos de IgG de KLH utilizando un procedimiento ELISA de IgG de KLH tal como se establece en general en el ejemplo 1 anterior. Puede observarse la ausencia de inmunosupresión, según se evidencia por los títulos de IgG de KLH que están por encima del fondo en una o más de las muestras tomadas después de una administración repetida de los nanovehículos sintéticos.

Después de una dosis inicial de 10 mg/kg, los nanovehículos sintéticos se administran entonces de forma repetida i.v. a sujetos humanos en una cantidad de dosis escalada sobre la base de la masa relativa entre ratón y ser humano a la misma dosis de 10 mg/kg. La frecuencia de dosificación repetida es semanal durante 3 semanas después de la administración inicial y posteriormente es mensual. Los sujetos humanos se supervisan para detectar signos clínicos de infecciones oportunistas u otros síntomas de un sistema inmunitario deprimido.

Ejemplo de referencia 3: Nanovehículos sintéticos tolerogénicos de tipo nanogel que utilizan antígeno endógeno administrados de forma repetida (profético)

Nanovehículos sintéticos de tipo nanogel que contienen ácido micofenólico se preparan de acuerdo con los procedimientos divulgados por M. Look et. al. "Nanogel-based delivery of mycophenolic acid ameliorates systemic lupus erythematosus in mice" J Clin Invest. doi:10.1172/JCI65907 (2013). Los nanovehículos sintéticos se administran inicialmente a ratones C57BL/6 diariamente durante 4 días a una dosis de 0,625 mg de MPA por kilogramo de peso corporal del animal ("mpk") por vía intravenosa, y después se administran de forma repetida i.v. mensualmente durante 6 meses después de la administración inicial. Se toman muestras de sangre el día 0, inmediatamente antes de cada una de las administraciones repetidas y una semana después de la administración repetida final.

Se analizan las muestras de sangre para establecer los títulos de IgG de KLH utilizando un procedimiento ELISA de IgG de KLH tal como se establece en general en el ejemplo 1 anterior. Puede observarse la ausencia de inmunosupresión, según se evidencia por los títulos de IgG de KLH que están por encima del fondo en una o más de las muestras tomadas después de una administración repetida de los nanovehículos sintéticos.

Los nanovehículos sintéticos se administran entonces de forma repetida i.v. a sujetos humanos en una cantidad de dosis, es decir, 0,625 mpk, escalada sobre la base de la masa relativa entre ratón y ser humano. La dosis inicial es diaria durante dos días. La frecuencia de dosificación repetida es mensual durante 6 meses después de la administración inicial, a 0,625 mpk. Los sujetos humanos se supervisan para detectar signos clínicos de infecciones oportunistas u otros síntomas de un sistema inmunitario deprimido.

Ejemplo de referencia 4: Proteína de fusión de antígeno que utiliza inmunomodulador endógeno administrada de forma repetida (profético)

Se genera una proteína de fusión que combina eritropoyetina con un fragmento de anticuerpo Fv monocatenario (scFv) específico de eritrocitos murinos utilizando la divulgación de Kontos et al., explicada en otra parte del presente documento. A continuación, la proteína de fusión se administra inicialmente i.v. a ratones hembra C57BL/6 de 12 semanas de edad diariamente durante 3 días con la dosis calculada para contener 10 µg de proteína de fusión por

dosis, y después se administra de forma repetida i.v. cada dos semanas durante 6 meses después de la administración inicial. Se toman muestras de sangre el día 0, inmediatamente antes de cada una de las administraciones repetidas y una semana después de la administración repetida final.

5 Se analizan las muestras de sangre para establecer los títulos de IgG de KLH utilizando un procedimiento ELISA de IgG de KLH tal como se establece en general en el ejemplo 1 anterior. Puede observarse la ausencia de inmunosupresión, según se evidencia por los títulos de IgG de KLH que están por encima del fondo en una o más de las muestras tomadas después de una administración repetida de los nanovehículos sintéticos.

10 Después se genera una proteína de fusión humana, que incluye eritropoyetina humana y un fragmento scFV específico para eritrocitos humanos. A continuación, la proteína de fusión se administra inicialmente i.v. diariamente durante tres días a sujetos humanos en una cantidad de dosis basada en la dosis de ratón de 10 µg, escalada sobre la base del volumen de sangre relativo entre el ratón y el ser humano. La dosis repetida es la misma que la dosis inicial. La frecuencia de administración repetida es mensual durante 6 meses después de la administración inicial, a la mitad de la dosis inicial. Los sujetos humanos se supervisan para detectar signos clínicos de infecciones oportunistas u otros síntomas de un sistema inmunitario deprimido.

Ejemplo de referencia 5: Nanovehículos sintéticos tolerogénicos que utilizan antígeno de ARNm exógeno e inmunomodulador exógeno administrados de forma repetida (profético)

20 Un sistema degradable de nanovehículo sintético compuesto por un núcleo poli(β-amino-éster) sensible al pH (PBAE) y una envoltura de fosfolípidos se prepara de acuerdo con la divulgación de Su et al., "In vitro and in vivo mRNA delivery using lipid-enveloped pH responsive polymer nanoparticles" Mol Pharm. 6 de junio de 2011; 8(3): 774-787 ("Su"). Se sigue la estrategia de formulación de doble emulsión, y ácido micofenólico, presente como una solución que tiene una concentración de MPA de 100 mg/ml, se encapsula en la emulsión primaria y posteriormente en los nanovehículos sintéticos. Véase también Moon et al., "Interbilayer-Crosslinked Multilamellar Vesicles as Synthetic Vaccines for Potent Humoral and Cellular Immune Responses" Nat Mater. Marzo de 2011; 10(3): 243-251 para otras estrategias de encapsulación que se pueden utilizar. A continuación, el ARNm para EPO se acopla a los nanovehículos sintéticos, de acuerdo con los procedimientos divulgados en general por Su. Alternativamente, puede utilizarse ARNm que codifica otras proteínas terapéuticas, tales como vacunas basadas en ARNm o reemplazos de proteínas, tal como se establece por Su.

35 A continuación, los nanovehículos sintéticos se administran inicialmente mediante infusión i.v. a monos Rhesus con la dosis calculada para que contenga 7 mg/kg de nanovehículos sintéticos, y después se administran de forma repetida i.v. cada dos meses durante 6 meses después de la administración inicial. Se toman muestras de sangre el día 0, inmediatamente antes de cada una de las administraciones repetidas y una semana después de la administración repetida final.

40 Se analizan las muestras de sangre para establecer los títulos de IgG de KLH utilizando un procedimiento ELISA de IgG de KLH tal como se establece en general en el ejemplo 1 anterior. Puede observarse la ausencia de inmunosupresión, según se evidencia por los títulos de IgG de KLH que están por encima del fondo en una o más de las muestras tomadas después de una administración repetida de los nanovehículos sintéticos.

45 Los nanovehículos sintéticos se administran entonces de forma repetida i.v. a sujetos humanos en una cantidad de dosis basada en la duplicación de la dosis inicial de 7 mg/kg (es decir, 14 mg/kg), escalada sobre la base de la masa relativa entre mono y ser humano. La frecuencia de administración repetida es mensual durante 6 meses después de la administración inicial. Los sujetos humanos se supervisan para detectar signos clínicos de infecciones oportunistas u otros síntomas de un sistema inmunitario deprimido.

Ejemplo de referencia 6: Nanovehículos sintéticos tolerogénicos que utilizan antígeno de ADNc exógeno e inmunomodulador exógeno administrados de forma repetida (profético)

55 Se preparan nanovehículos sintéticos de formato Genosphere. La rapamicina se encapsula en los nanovehículos sintéticos disolviendo rapamicina en etanol y combinando la solución de rapamicina con la solución de lípidos para lograr una carga calculada de rapamicina del 4% p/p, con respecto al peso de los ingredientes secos añadidos a la formulación del nanovehículo. La fase de ADN comprende un plásmido que incorpora ADNc que codifica eritropoyetina ("EPO"), utilizando una tecnología de plásmido convencional que puede traducirse tanto a seres humanos como a primates no humanos.

60 Los nanovehículos sintéticos se administran inicialmente mediante infusión i.v. diaria durante dos días a monos macacos con la dosis calculada para que contenga 12 mg/kg de nanovehículos sintéticos, y después se administran de forma repetida i.v. mensualmente durante 6 meses después de la administración inicial comenzando con el doble de la dosis inicial (es decir, 24 mg/kg) y después disminuyendo progresivamente un 25% cada dos meses a partir de entonces (18 mg/kg, 12 mg/kg, 6 mg/kg). Se toman muestras de sangre el día 0, inmediatamente antes de cada una de las administraciones repetidas y una semana después de la administración repetida final.

Se analizan las muestras de sangre para establecer los títulos de IgG de KLH utilizando un procedimiento ELISA de IgG de KLH tal como se establece en general en el ejemplo 1 anterior. Puede observarse la ausencia de inmunosupresión, según se evidencia por los títulos de IgG de KLH que están por encima del fondo en una o más de las muestras tomadas después de una administración repetida de los nanovehículos sintéticos.

A continuación, los nanovehículos sintéticos se administran de forma repetida i.v. a sujetos humanos en una cantidad de dosis basada en la disminución progresiva de la dosis de mono de 24 mg/kg (por ejemplo, 24, 18, 12 y 6 mg/kg, produciéndose la disminución progresiva a intervalos de dos meses) que se administró de forma repetida en monos, escalada sobre la base de la masa relativa entre mono y ser humano. La frecuencia de administración repetida es mensual durante 6 meses después de la administración inicial. Los sujetos humanos se supervisan para detectar signos clínicos de infecciones oportunistas u otros síntomas de un sistema inmunitario deprimido.

Ejemplo de referencia 7: Nanovehículos sintéticos tolerogénicos que utilizan antígeno de ARNm exógeno e inmunomodulador exógeno administrados de forma repetida (profético)

Materiales

Se adquiere rapamicina de TSZ CHEM (185 Wilson Street, Framingham, MA 01702; producto en el N° de catálogo R1017). Se adquiere PLGA de aproximadamente 25.000 Da de Lakeshore Biochemicals (756 Tom Martin Dr Birmingham, AL 35211). Código de producto 5050 DLG 2.5A. Se adquiere copolímero de bloques PLA-PEG-OMe con un bloque de PEG terminado en metil éter de aproximadamente 5.000 Da y un bloque de PLA de 48.000 Da de Lakeshore Biochemicals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211). Código de producto 100 DL mPEG 5000 5CE. Se adquiere poli(alcohol vinílico) EMPROVE® 4-88, USP (hidrolizado al 85-89% , viscosidad de 3,4-4,6 mPa·s) de EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027). Número de parte 1.41354.

El ARNm modificado con factor estimulante de colonias de granulocitos humano recombinante (rhuG-CSF) se prepara de acuerdo con la divulgación de la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 2013/0115272 por Fougérolles et al.

Procedimiento

Se preparan soluciones de la forma siguiente: Solución 1: PLGA a 100 mg/ml en cloruro de metileno. La solución se prepara disolviendo PLGA en cloruro de metileno puro. Solución 2: PLA-PEG a 100 mg/ml en cloruro de metileno. La solución se prepara disolviendo PLA-PEG en cloruro de metileno puro. Solución 3: Rapamicina a 50 mg/ml en cloruro de metileno. La solución se prepara disolviendo rapamicina en cloruro de metileno puro. Solución 4: ARNm modificado con rhuG-CSF a 20 mg/ml en HCl 0,13 M. La solución se prepara disolviendo el ARNm en HCl 0,13 M. Solución 5: Poli(alcohol vinílico) a 50 mg/ml en tampón fosfato 100 mM pH 8. Solución 6: Tampón fosfato 70 mM, pH 8. En primer lugar se crea una emulsión primaria (W1/O) mezclando las soluciones 1 a 4.

La solución 1 (0,75 ml), la solución 2 (0,25 ml), la solución 3 (0,20 ml) y la solución 4 (0,2 ml) se combinan en un pequeño tubo de presión de vidrio y se sonicar al 50% de amplitud durante 40 segundos utilizando un sonicador digital de Branson 250. Después se forma una emulsión secundaria (W1/O/W2) mediante la adición de la solución 5 (3,0 ml) a la emulsión primaria, agitación en vórtice para crear una dispersión bruta y, a continuación, sonicación al 30% de amplitud durante 60 segundos utilizando el sonicador digital de Branson 250. La emulsión secundaria se añade a un vaso de precipitados abierto de 50 ml que contenía la solución 6 (30 ml) y se agita a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que el diclorometano se evapore y los nanovehículos se formen en suspensión. A continuación, se lava una parte de los nanovehículos suspendidos transfiriendo la suspensión de los nanovehículos a un tubo de centrifuga, centrifugando a 75.600 rcf durante 35 minutos, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en solución salina tamponada con fosfato. Se repite este proceso de lavado y después se resuspende el sedimento en PBS 1X para lograr una suspensión de nanovehículo que tiene una concentración nominal de 10 mg/ml sobre una base de polímero. La suspensión se almacena congelada a -20 °C hasta su uso.

Después, los nanovehículos sintéticos se administran inicialmente por medio de infusión i.v. al día durante dos días a monos macacos con la dosis calculada para que contenga 12 mg/kg de nanovehículos sintéticos, y a continuación se administran de forma repetida i.v. mensualmente durante 6 meses después de la administración inicial a la misma dosis (es decir, 12 mg/kg). Se toman muestras de sangre el día 0, inmediatamente antes de cada una de las administraciones repetidas y una semana después de la administración repetida final.

Se analizan las muestras de sangre para establecer los títulos de IgG de KLH utilizando un procedimiento ELISA de IgG de KLH tal como se establece en general en el ejemplo 1 anterior. Puede observarse la ausencia de inmunosupresión, según se evidencia por los títulos de IgG de KLH que están por encima del fondo en una o más de las muestras tomadas después de una administración repetida de los nanovehículos sintéticos.

Los nanovehículos sintéticos se administran después de forma repetida i.v. a sujetos humanos en una cantidad de dosis basada en la dosis inicial de 12 mg/kg que se administró de forma repetida en monos, escalada sobre la base de la masa relativa entre mono y ser humano. La frecuencia de administración repetida es mensual durante 6 meses

después de la administración inicial. Los sujetos humanos se supervisan para detectar signos clínicos de infecciones oportunistas u otros síntomas de un sistema inmunitario deprimido.

Ejemplo de referencia 8: Nanovehículos sintéticos tolerógenos que utilizan antígeno de ARNm exógeno e inmunomodulador exógeno administrados de forma repetida (profético)

Se repiten los procedimientos del ejemplo 7, excepto que el ARNm modificado de factor estimulante de colonias de granulocitos humano recombinante (rhuG-CSF) se reemplaza por ARNm modificado con eritropoyetina humana recombinante (huEPO). El ARNm modificado con eritropoyetina humana (rhuEPO) se prepara de acuerdo con la divulgación de la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 2013/0115272 por Fougerolles et al.

Ejemplo de referencia 9: Nanopartículas de sílice mesoporosa con ibuprofeno acoplado (profético)

Se crean núcleos de nanopartículas de SiO₂ mesoporoso por medio de un procedimiento de sol-gel. Se disuelve bromuro de hexadeciltrimetil-amonio (CTAB) (0,5 g) en agua desionizada (500 ml) y después se añade una solución acuosa de NaOH 2 M (3,5 ml) a la solución de CTAB. La solución se agita durante 30 min y después se añade tetraetoxisilano (TEOS) (2,5 ml) a la solución. El gel resultante se agita durante 3 h a una temperatura de 80 °C. El precipitado blanco que se forma se captura mediante filtración, seguida de lavado con agua desionizada y secado a temperatura ambiente. A continuación, el tensioactivo restante se extrae de las partículas mediante suspensión en una solución etanólica de HCl durante la noche. Las partículas se lavan con etanol, se centrifugan y se redispersan con ultrasonidos. Este proceso de lavado se repite dos veces más.

Después, las nanopartículas de SiO₂ se funcionalizan con grupos amino utilizando (3-aminopropil)-triethoxisilano (APTMS). Para realizar esta funcionalización, las partículas se suspenden en etanol (30 ml) y se añade APTMS (50 µl) a la suspensión. Se deja reposar la suspensión a temperatura ambiente durante 2 h y después se hierve durante 4 h, manteniendo constante el volumen mediante la adición periódica de etanol. Los reactantes restantes se eliminan mediante cinco ciclos de lavado por centrifugación y redispersión en etanol puro.

En una reacción separada, se crean semillas de oro de 1-4 nm de diámetro. Toda el agua utilizada en esta reacción se desioniza primero y después se destila del vidrio. Se añade agua (45,5 ml) a un matraz de fondo redondo de 100 ml. Mientras se agita, se añade NaOH acuoso 0,2 M (1,5 ml), seguido de una solución acuosa al 1% de cloruro de tetraquis(hidroximetil)fosfonio (THPC) (1,0 ml). Dos minutos después de la adición de la solución de THPC, se añade una solución acuosa de 10 mg/ml de ácido cloroáurico (2 ml), que se ha envejecido al menos durante 15 minutos. Las semillas de oro se purifican mediante diálisis contra agua.

Para formar los nanovehículos de núcleo-envoltura, las nanopartículas de SiO₂ funcionalizadas con amino formadas anteriormente se mezclan en primer lugar con las semillas de oro durante 2 h a temperatura ambiente. Las partículas de SiO₂ decoradas con oro se recogen mediante centrifugación y se mezclan con una solución acuosa de ácido cloroáurico y bicarbonato de potasio para formar la envoltura de oro. A continuación, las partículas se lavan por centrifugación y se vuelven a dispersar en agua. Se carga ibuprofeno suspendiendo las partículas en una solución de ibuprofeno sódico (1 mg/l) durante 72 h. El ibuprofeno libre se lava después de las partículas mediante centrifugación y redispersión en agua.

Ejemplo de referencia 10: Liposomas que contienen ciclosporina A (profético)

Los liposomas se forman utilizando hidratación de película fina. Se disuelven 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC) (32 µmol), colesterol (32 µmol) y ciclosporina A (6,4 µmol) en cloroformo puro (3 ml). Esta solución lipídica se añade a un matraz de fondo redondo de 50 ml y el disolvente se evapora en un evaporador rotatorio a una temperatura de 60 °C. A continuación, el matraz se purga con gas nitrógeno para eliminar el disolvente restante. Se añaden al matraz solución salina tamponada con fosfato (2 ml) y cinco perlas de vidrio, y la película lipídica se hidrata agitando a 60 °C durante 1 h para formar una suspensión. La suspensión se transfiere a un pequeño tubo de presión y se sonica a 60 °C durante cuatro ciclos de pulsos de 30 s con un retraso de 30 s entre cada uno de los pulsos. A continuación, se deja reposar la suspensión a temperatura ambiente durante 2 h para permitir una hidratación completa. Los liposomas se lavan mediante centrifugación seguida de resuspensión en solución salina tamponada con fosfato de recién preparada.

Ejemplo 11: Nanovehículo polimérico que contiene conjugado de polímero-rapamicina (profético)

Preparación del conjugado de PLGA-rapamicina:

Se disuelve polímero de PLGA con grupo ácido terminal (7525 DLG1A, índice de acidez 0,46 mmol/g, Lakeshore Biomaterials; 5 g, 2,3 mmol, 1,0 eq) en 30 ml de diclorometano (DCM). Se añade N,N-diciclohexilcarbodiimida (1,2 eq, 2,8 mmol, 0,57 g) seguida de rapamicina (1,0 eq, 2,3 mmol, 2,1 g) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (2,0 eq, 4,6 mmol, 0,56 g). La mezcla se agita a ta durante 2 días. Después, la mezcla se filtra para eliminar la diciclohexilurea insoluble. El filtrado se concentra a aproximadamente 10 ml de volumen y se añade a 100 ml de alcohol isopropílico (IPA) para precipitar el conjugado de PLGA-rapamicina. Se retira la capa de IPA y después se lava el polímero con 50 ml de IPA.

y 50 ml de metil t-butil éter (MTBE). A continuación, el polímero se seca al vacío a 35 °C durante 2 días para dar PLGA-rapamicina en forma de un sólido blanco (aproximadamente 6,5 g).

Preparación de nanovehículo que contiene conjugado de PLGA-rapamicina y péptido de ovoalbúmina (323-339):

El nanovehículo que contiene PLGA-rapamicina se prepara de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1 de la forma siguiente:

Las soluciones para la formación de nanovehículos se preparan de la forma siguiente:

Solución 1: Péptido de ovoalbúmina 323-339 a 20 mg/ml en solución acuosa de ácido clorhídrico diluido. La solución se prepara disolviendo péptido de ovoalbúmina en una solución de ácido clorhídrico 0,13 M a temperatura ambiente. Solución 2: PLGA-rapamicina a 100 mg/ml en cloruro de metileno. La solución se prepara disolviendo PLGA-rapamicina en cloruro de metileno puro. Solución 3: PLA-PEG a 100 mg/ml en cloruro de metileno. La solución se prepara disolviendo PLA-PEG en cloruro de metileno puro. Solución 4: Poli(alcohol vinílico) a 50 mg/ml en tampón fosfato 100 mM pH 8.

En primer lugar se prepara una emulsión primaria de agua en aceite. Se prepara W1/O1 combinando la solución 1 (0,2 ml), la solución 2 (0,75 ml) y la solución 3 (0,25 ml) en un tubo de presión pequeño y sonicando al 50% de amplitud durante 40 segundos utilizando un sonicador digital de Branson 250. Se prepara una emulsión secundaria (W1/O1/W2) combinando la solución 4 (3,0 ml) con la emulsión primaria W1/O1, agitando en vórtice durante 10 s y sonicando al 30% de amplitud durante 60 segundos utilizando el sonicador digital de Branson 250. La emulsión W1/O1/W2 se añade a un vaso de precipitados que contiene una solución de tampón fosfato 70 mM a pH 8 (30 ml) y se agita a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que se evapore el cloruro de metileno y que se formen los nanovehículos. Una porción de los nanovehículos se lava transfiriendo la suspensión de nanovehículos a un tubo de centrífuga y centrifugando a 75.600 x g y 4 °C durante 35 min, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en solución salina tamponada con fosfato. Se repite el procedimiento de lavado y el sedimento se resuspende en solución salina tamponada con fosfato para obtener una dispersión de nanovehículo final de aproximadamente 10 mg/ml.

Ejemplo de referencia 12: Preparación de nanovehículos de oro (AuNC) que contienen rapamicina (profético)

Preparación de HS-PEG-rapamicina:

Una solución de disulfuro de ácido de PEG (1,0 eq), rapamicina (2,0-2,5 eq), DCC (2,5 eq) y DMAP (3,0 eq) en DMF seca se agita a ta durante la noche. La dicitohexilurea insoluble se elimina por filtración y el filtrado se añade a alcohol isopropílico (IPA) para precipitar el éster de disulfuro de PEG-di-rapamicina y se lava con IPA y se seca. A continuación, el polímero se trata con hidrocloreuro de tris(2-carboxietil)fosfina en DMF para reducir el disulfuro de PEG a éster de rapamicina tiol PEG (HS-PEG-rapamicina). El polímero resultante se recupera por precipitación de IPA y se seca tal como se ha descrito previamente y se analiza por RMN de H y GPC.

Formación de NC de Oro (AuNC):

Una solución ac. de 500 ml de HAuCl₄ 1 mM se calienta a reflujo durante 10 min con agitación vigorosa en un matraz de fondo redondo de 1 l equipado con un condensador. A continuación, se añade rápidamente una solución de 50 ml de citrato trisódico 40 mM a la solución en agitación. La solución de color rojo vino intenso resultante se mantiene a reflujo durante 25-30 min y se retira el calentamiento y la solución se enfría a temperatura ambiente. A continuación, la solución se filtra a través de un filtro de membrana de 0,8 µm para dar la solución de AuNC. Los AuNC se caracterizan utilizando espectroscopia visible y microscopia electrónica de transmisión. Los AuNC tienen un diámetro de 20 nm cubierto por citrato con un pico de absorción a 520 nm.

Los AuNC se conjugan con HS-PEG-rapamicina:

Una solución de 150 µl de HS-PEG-rapamicina (10 µM en tampón carbonato 10 mM pH 9,0) se añade a 1 ml de nanovehículos de oro cubiertos con citrato de 20 nm de diámetro (1,16 nM) para producir una relación molar de tiol a oro de 2500:1. La mezcla se agita a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante 1 hora para permitir el intercambio completo de tiol por citrato en los nanovehículos de oro. Los AuNC con PEG-rapamicina presentes en la superficie se purifican después mediante centrifugación a 12.000 g durante 30 minutos. Se decanta el sobrenadante y después se lava el sedimento que contiene AuNC-S-PEG-rapamicina con tampón PBS 1x. Los nanovehículos de Oro-PEG-rapamicina purificados se resuspenden después en un tampón adecuado para análisis y bioensayos adicionales.

Ejemplo de referencia 13: Liposomas que contienen rapamicina y ovoalbúmina (profético)

Los liposomas se forman por hidratación de película fina. Se disuelven 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) (32 µmol), colesterol (32 µmol) y rapamicina (6,4 µmol) en cloroformo puro (3 ml). Esta solución lipídica se añade a un

tubo de vidrio de 10 ml y el disolvente se separa bajo una corriente de gas nitrógeno y se deseca durante 6 horas al vacío. Se obtienen vesículas multilaminares por hidratación de la película con 2,0 ml de tampón MOPS 25 mM pH 8,5, que contiene una cantidad en exceso de ovoalbúmina. El tubo se agita en vórtice hasta que la película lipídica se desprende de la superficie del tubo. Para romper las vesículas multilaminares en monolaminares, se aplican diez ciclos de congelación (nitrógeno líquido) y descongelación (baño de agua a 30 °C). A continuación, la muestra se diluye a 1 ml en tampón MOPS 25 mM pH 8,5. El tamaño del liposoma resultante se homogeneiza por extrusión haciendo pasar la muestra 10 veces a través de filtros de policarbonato de poros de 200 nm. Los liposomas resultantes se utilizan después para análisis y bioensayos adicionales.

Ejemplo de referencia 14: Diversos nanovehículos sintéticos tolerogénicos adicionales que utilizan antígeno endógeno administrados de forma repetida (profético)

Los nanovehículos sintéticos divulgados en los ejemplos 9, 10 y 12 se administran inicialmente a ratones C57BL/6 por vía intravenosa diariamente durante 4 días a una dosis de nanovehículos sintéticos que proporciona 30 µg de inmunomodulador por dosis, y después se administran de forma repetida i.v. mensualmente durante 6 meses después de la administración inicial. Se toman muestras de sangre el día 0, inmediatamente antes de cada una de las administraciones repetidas y una semana después de la administración repetida final.

Se analizan las muestras de sangre para establecer los títulos de IgG de KLH utilizando un procedimiento ELISA de IgG de KLH tal como se establece en general en el ejemplo 1 anterior. Puede observarse la ausencia de inmunosupresión, según se evidencia por los títulos de IgG de KLH que están por encima del fondo en una o más de las muestras tomadas después de una administración repetida de los nanovehículos sintéticos.

Los nanovehículos sintéticos se administran entonces de forma repetida i.v. a sujetos humanos en una cantidad de dosis escalada sobre la base del volumen relativo de sangre entre ratón y ser humano. La dosis inicial es diaria durante tres días. La frecuencia de dosificación repetida es mensual durante 6 meses después de la administración inicial, a la misma dosis que la dosis inicial. Los sujetos humanos se supervisan para detectar signos clínicos de infecciones oportunistas u otros síntomas de un sistema inmunitario deprimido.

Ejemplo de referencia 15: Nanovehículos sintéticos tolerogénicos que utilizan antígeno exógeno e inmunomodulador exógeno administrados de forma repetida (profético)

Los nanovehículos sintéticos de los ejemplos 11 y 13 se administran inicialmente por medio de infusión i.v. diaria durante dos días a beagles hembras con la dosis calculada para que contenga 25 mg/kg de nanovehículos sintéticos, y después se administran de forma repetida i.v. mensualmente durante 6 meses después de la administración inicial a la misma dosis. Se toman muestras de sangre el día 0, inmediatamente antes de cada una de las administraciones repetidas y una semana después de la administración repetida final.

Se analizan las muestras de sangre para establecer los títulos de IgG de KLH utilizando un procedimiento ELISA de IgG de KLH tal como se establece en general en el ejemplo 1 anterior. Puede observarse la ausencia de inmunosupresión, según se evidencia por los títulos de IgG de KLH que están por encima del fondo en una o más de las muestras tomadas después de una administración repetida de los nanovehículos sintéticos.

Los nanovehículos sintéticos se administran después de forma repetida i.v. a sujetos humanos en una cantidad de dosis basada en la dosis de 25 mg/kg administrada de forma repetida a los beagle, escalada sobre la base de la masa relativa entre beagles y seres humanos. La frecuencia de administración repetida es mensual durante 6 meses después de la administración inicial. Los sujetos humanos se supervisan para detectar signos clínicos de infecciones oportunistas u otros síntomas de un sistema inmunitario deprimido.

Ejemplo de referencia 16: Diversos nanovehículos sintéticos tolerogénicos adicionales que utilizan antígeno exógeno administrados de forma repetida (profético)

Los nanovehículos sintéticos divulgados en los ejemplos 9, 10 y 12 se administran inicialmente a ratones C57BL/6 por vía intravenosa diariamente durante 4 días a una dosis de nanovehículos sintéticos que proporciona 30 µg de inmunomodulador por dosis, y después se administran de forma repetida i.v. mensualmente durante 6 meses después de la administración inicial. El ARNm modificado con eritropoyetina humana recombinante (rhuEPO) del ejemplo 7 se administra de forma concomitante con los nanovehículos sintéticos, específicamente dentro de las 24 horas siguientes a cada una de las dosis de nanovehículos sintéticos. Se administra suficiente ARNm para alcanzar 10 miliunidades por mililitro de huEPO. Se toman muestras de sangre el día 0, inmediatamente antes de cada una de las administraciones repetidas y una semana después de la administración repetida final.

Se analizan las muestras de sangre para establecer los títulos de IgG de KLH utilizando un procedimiento ELISA de IgG de KLH tal como se establece en general en el ejemplo 1 anterior. Puede observarse la ausencia de inmunosupresión, según se evidencia por los títulos de IgG de KLH que están por encima del fondo en una o más de las muestras tomadas después de una administración repetida de los nanovehículos sintéticos.

Los nanovehículos sintéticos se administran entonces de forma repetida i.v. a sujetos humanos en una cantidad de dosis escalada sobre la base del volumen relativo de sangre entre ratón y ser humano. El ARNm modificado que codifica rhuEPO (tal como se ha descrito anteriormente) se dosifica concomitantemente (en este caso, dentro de las 24 horas) en una cantidad administrada para alcanzar 10-20 miliunidades por mililitro de rhuEPO en los sujetos humanos. La dosis inicial es diaria durante tres días. La frecuencia de dosificación repetida es mensual durante 6 meses después de la administración inicial, a la misma dosis que la dosis inicial. Los sujetos humanos se supervisan para detectar signos clínicos de infecciones oportunistas u otros síntomas de un sistema inmunitario deprimido.

Ejemplo de referencia 17: El metotrexato (MTX) da lugar a tolerancia inmunológica específica de antígeno

A ratones hembra C57BL/6 de la misma edad (5-6 semanas) se inyectaron 5 veces por vía intravenosa en la vena de la cola inyecciones semanales de 25 µg de una forma en partículas inmunogénica de ovoalbúmina de pollo (pOVA). Un grupo de animales recibió 3 inyecciones intraperitoneales de 200 µg de MTX junto con las 3 primeras inyecciones de antígeno el mismo día y los 2 días siguientes. El grupo sin tratar recibió solo antígeno, mientras que el grupo tratado recibió 9 inyecciones en total de MTX i.p. (días 1-3, 7-9, 14-16). Los días 4º y 5º de la inyección, todos los animales recibieron 20 µg de hemocianina de lapa californiana (KLH) por vía subcutánea en las extremidades traseras mezclada con 2 µg de CpG además de la inyección i.v. de pOVA.

Las respuestas de anticuerpos anti-KLH y anti-OVA se supervisaron en la sangre en estos animales en diferentes puntos temporales. Tal como se muestra en la figura 2 en ausencia de cualquier tratamiento, los animales desarrollaron una fuerte respuesta inmunitaria contra OVA. Por el contrario, la administración de MTX bloqueó la respuesta de anticuerpos y solo se detectaron títulos mínimos, incluso después de 5 inyecciones con el antígeno. Cuando se inyectaron KLH y CpG después de los tratamientos con MTX (a partir del d21), se pudo detectar una respuesta anti-KLH robusta en todos los grupos. Estos resultados demuestran que el efecto inmunosupresor de MTX se suprimió después del día 21 y que el efecto tolerogénico de las inyecciones de MTX se restringió al antígeno administrado concomitantemente (OVA) (no al antígeno proporcionado después del periodo de tratamiento con MTX).

Por consiguiente, estos resultados demuestran que las administraciones repetidas de inyecciones concomitantes con MTX y antígeno pueden prevenir la formación de anticuerpos específicos de antígeno sin dar lugar a inmunosupresión. Por lo tanto, se demostró que el protocolo no induce inmunosupresión tras la administración repetida.

Ejemplo de referencia 18: El metotrexato (MTX) da lugar a la inducción de tolerancia a múltiples antígenos y vías

Con el fin de analizar si inyecciones múltiples de MTX pueden dar lugar al establecimiento de tolerancia inmunológica, se inyectaron a ratones hembra C57BL/6 de la misma edad (5-6 semanas) por vía intravenosa en la vena de la cola inyecciones semanales de 200 µg de hemocianina de lapa californiana (KLH) y por vía subcutánea en las extremidades traseras 25 µg de una forma en partículas de ovoalbúmina de pollo (pOVA) mezclada con 2 µg de oligodesoxinucleótidos CpG (ODN). Con las tres primeras inyecciones de antígeno, un grupo de animales recibió 3 inyecciones intraperitoneales de MTX el mismo día y los 2 días siguientes. Todos los animales recibieron 5 inyecciones de antígeno (d0, 7, 14, 21 y 28) y un grupo recibió 9 inyecciones adicionales de MTX i.p. (días 1-3, 7-9, 14-16).

Las respuestas de anticuerpos anti-KLH y anti-OVA se supervisaron en la sangre en estos animales en diferentes puntos temporales. Tal como se muestra en la figura 3, en ausencia de tratamiento, los animales desarrollaron una fuerte respuesta inmunitaria contra KLH y OVA que se puede medir por los títulos de anticuerpos IgG anti-KLH y anti-OVA. Por el contrario, la administración de MTX bloqueó ambas respuestas y los animales mostraron títulos bajos incluso después de 5 inyecciones con el antígeno.

Por consiguiente, estos resultados demuestran que las administraciones repetidas de inyecciones concomitantes con MTX y antígeno pueden prevenir la formación de anticuerpos específicos de antígeno sin dar lugar a inmunosupresión. Esto se encontró con más de un antígeno y con administración por diferentes vías. Además, se demostró que el protocolo no induce inmunosupresión tras la administración repetida.

Ejemplo 19: Modelo OTI utilizando ERY1-OVA

Material:

Ovoalbúmina activada con maleimida Imject: se obtuvieron Thermoscientific, Producto Nº 77126, Lote Nº OF185798, 10 mg, y péptido ERY1 (secuencia: Trp-Met-Val-Leu-Pro-Trp-Leu-Pro-Gly-Thr-Leu-Asp-Gly-Gly-Ser-Gly-Cys-Arg-Gly-NH₂) (SEQ ID NO: 1), CSBio, Producto Nº CS11662, Lote Nº M613, MW 2001, sal de TFA, 6 mg, agua ultrapura y tampón PBS 1x.

Procedimientos

Se disolvió OVA activada con maleimida Imject (10 mg) en 2 ml de agua ultrapura. A esta solución se añadió una solución de péptido ERY1 (6 mg) en 0,6 ml de agua ultrapura. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente

durante 1 h y después a 8 °C durante la noche. La solución ligeramente turbia se diluyó con 3 ml de PBS 1x y se filtró a través de un filtro de 0,45 micrómetros. A continuación, el filtrado se lavó en un tubo de diafiltración Amicon-15 MWCO de 10 KD con agua ultrapura para eliminar el exceso de péptido ERY1. A continuación, el concentrado se diluyó con agua ultrapura hasta una concentración de 1 mg/ml (aproximadamente 9 ml). La solución se filtró finalmente a través de un filtro de 0,2 micrómetros para dar la solución de conjugado ERY1-OVA (1 mg/ml, aproximadamente 9 ml). El análisis de HPLC confirmó el material como conjugado de ERY1-OVA.

Inducción de tolerancia de células T CD8+ utilizando péptido de unión a eritrocitos:

Un péptido de 12 aa sintético (ERY1) descubierto mediante presentación en fagos que se une a glicoforina-A de ratón específicamente ({Kontos, 2013 N° 8387}) está presente únicamente en los eritrocitos y puede conjugarse con antígenos a eritrocitos diana e inducir tolerancia inmunológica. Sin vincularse a ninguna teoría particular, se cree que la unión a eritrocitos da como resultado la manipulación del antígeno como un autoantígeno durante el reciclaje y recambio de eritrocitos.

Para observar delección o anergia de células T CD8+ después de la administración de ERY1 conjugado a ovoalbúmina (OVA), se aislaron células T de animales transgénicos OTI+ que expresan una TCR que reconoce un péptido de OVA en el complejo MHC-CLII. Estas células se transfirieron el día 1 a animales con un pequeño desajuste en las moléculas CD45 (CD45.1+) para poder rastrear las células del donante (CD45.2+). Un grupo de animales (n = 3) permaneció sin tratar y sin inmunizar (virgen), otro grupo de animales permaneció sin tratar, pero se inmunizó (sin tratamiento) mientras que el último grupo recibió OVA conjugado con ERY1 los días 0 y 5. Todos los animales (excepto el primero, grupo "virgen") se inmunizaron con OVA (10 µg) y CpG ODN (10 µg) en la extremidad trasera por vía subcutánea el día 14. Cinco días después (día 19) se sacrificaron todos los animales y los ganglios linfáticos que drenaban el sitio de inmunización (poplítea) se escindieron y se analizaron para determinar la presencia de las células CD45.2 OTI+ transferidas mediante FACS.

Tal como se muestra en la figura 4, los animales que permanecieron vírgenes tienen aproximadamente $0,7 \times 10^4$ células OTI+ en sus ganglios linfáticos. Las inyecciones de OVA CpG inducen la activación y aproximadamente una expansión de 30 veces de estas células (21×10^4), mientras que el tratamiento con complejos de ERY1-OVA dio como resultado la inhibición completa de las capacidades proliferativas de las células OTI. Estos resultados demuestran que las composiciones descritas en el presente documento pueden destruir la capacidad de las células T CD8+ de reconocer y activarse en presencia del antígeno. Esto ilustra la capacidad para una regulación a la baja no duradera y específica de antígeno de una respuesta inmunitaria como resultado de un inmunoterapéutico específico de antígeno tal como se describe en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunoterapéutica específica de antígeno para su uso en la inducción de tolerancia específica de antígeno, en la que la administración repetida de la composición a un sujeto no induce inmunosupresión, y en la que la composición comprende nanovehículos sintéticos poliméricos acoplados a un inhibidor de mTOR, en la que el inhibidor de mTOR es rapamicina o un análogo de rapamicina y en la que
- 5 (a) la composición comprende además un antígeno exógeno; o
- (b) la composición se administra concomitantemente con un antígeno exógeno en la misma composición o en composiciones separadas; o
- 10 (c) la composición no comprende un antígeno exógeno y se administra: (i) antes de la administración de un antígeno exógeno; y/o (ii) después de la administración de un antígeno exógeno; en la que el antígeno es una proteína terapéutica, o un fragmento antigénico de la misma, que no está acoplada al inhibidor de mTOR.
- 15 2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la carga del inhibidor de mTOR en promedio es al menos el 95%, 97%, 98% o 99% (peso/peso).
3. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína terapéutica es una enzima.
- 20 4. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende más de un antígeno exógeno.
5. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la administración repetida se produce 1 semana después de una dosis inicial o una administración repetida previa de la composición.
- 25 6. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la administración repetida se produce 2 semanas después de una dosis inicial o una administración repetida previa de la composición.
- 30 7. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la administración repetida se produce de 1 a 12 meses después de una dosis inicial o una administración repetida previa de la composición.
8. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición está comprendida en un kit.
- 35

Resultados de la administración repetida de inmunoterapéutico específico de antígeno

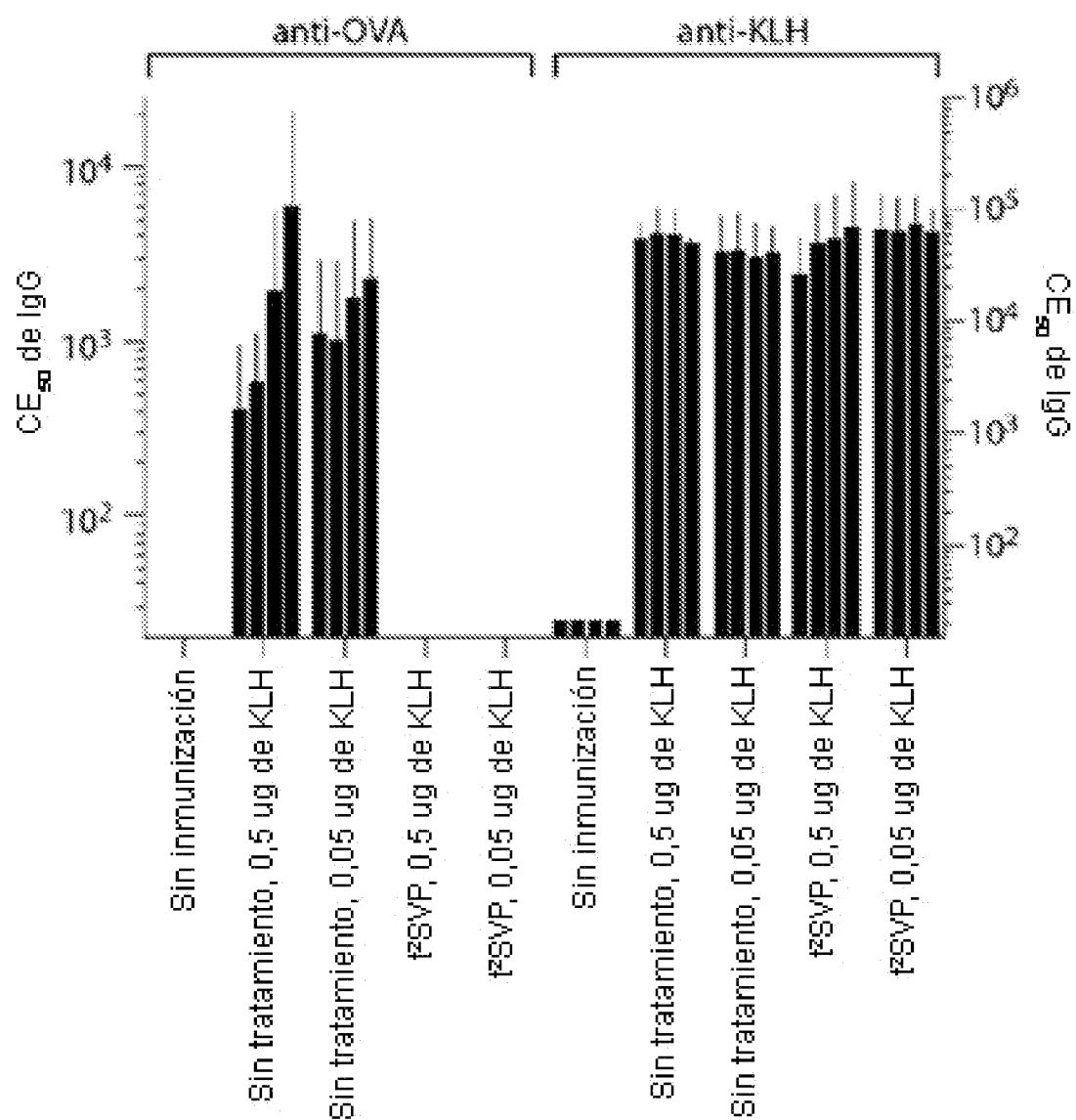


Fig. 1

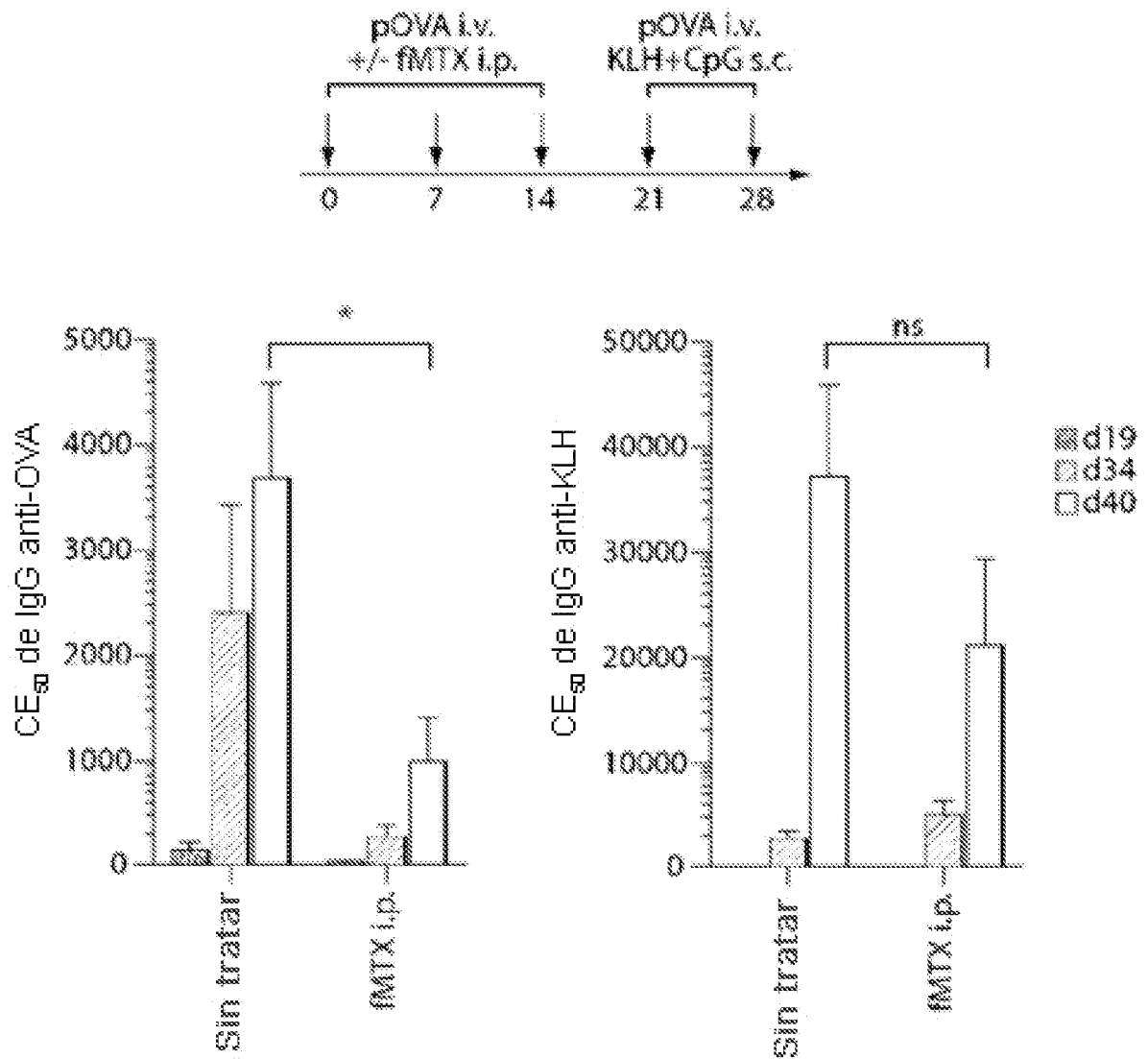


Fig. 2

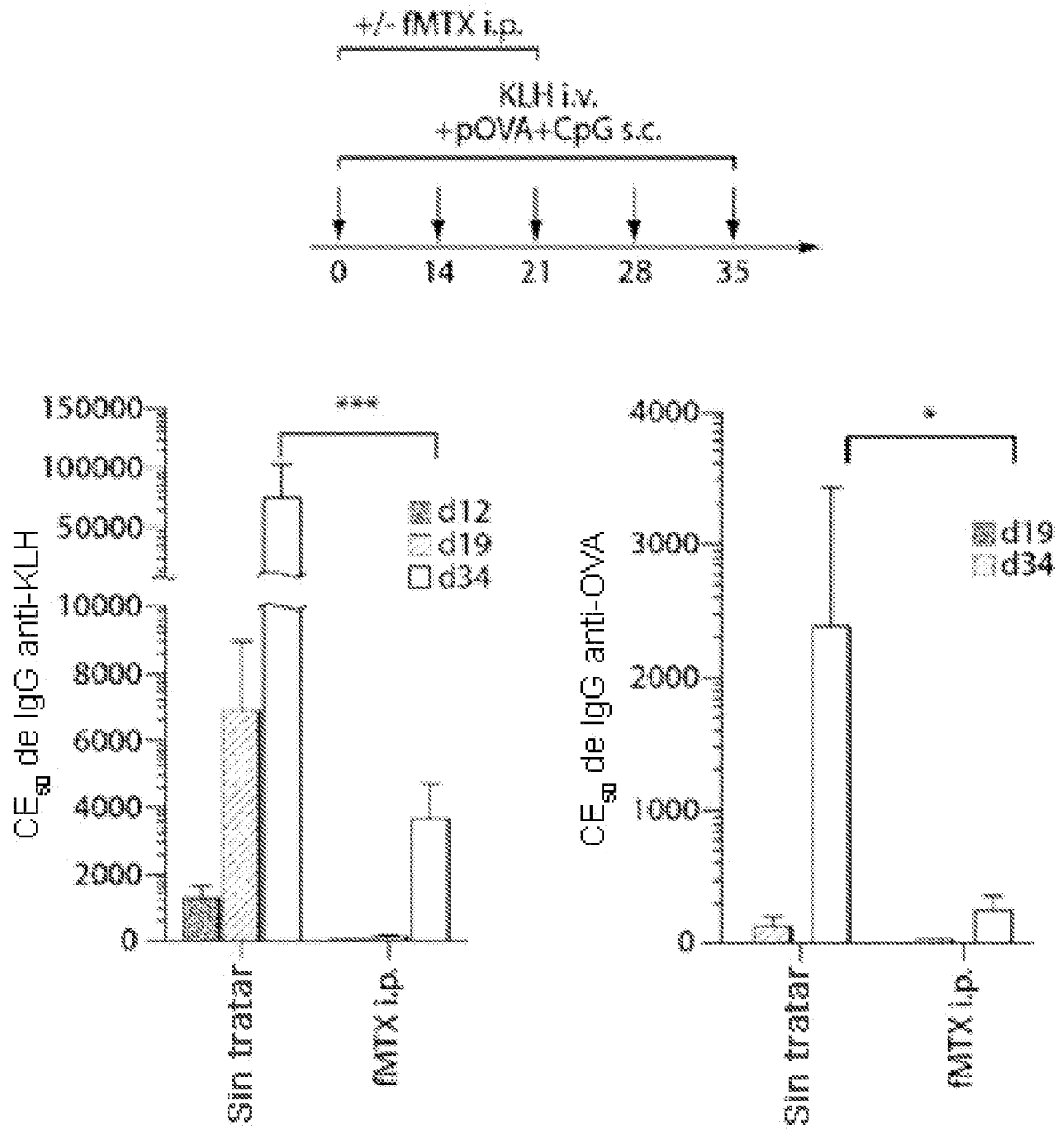


Fig. 3

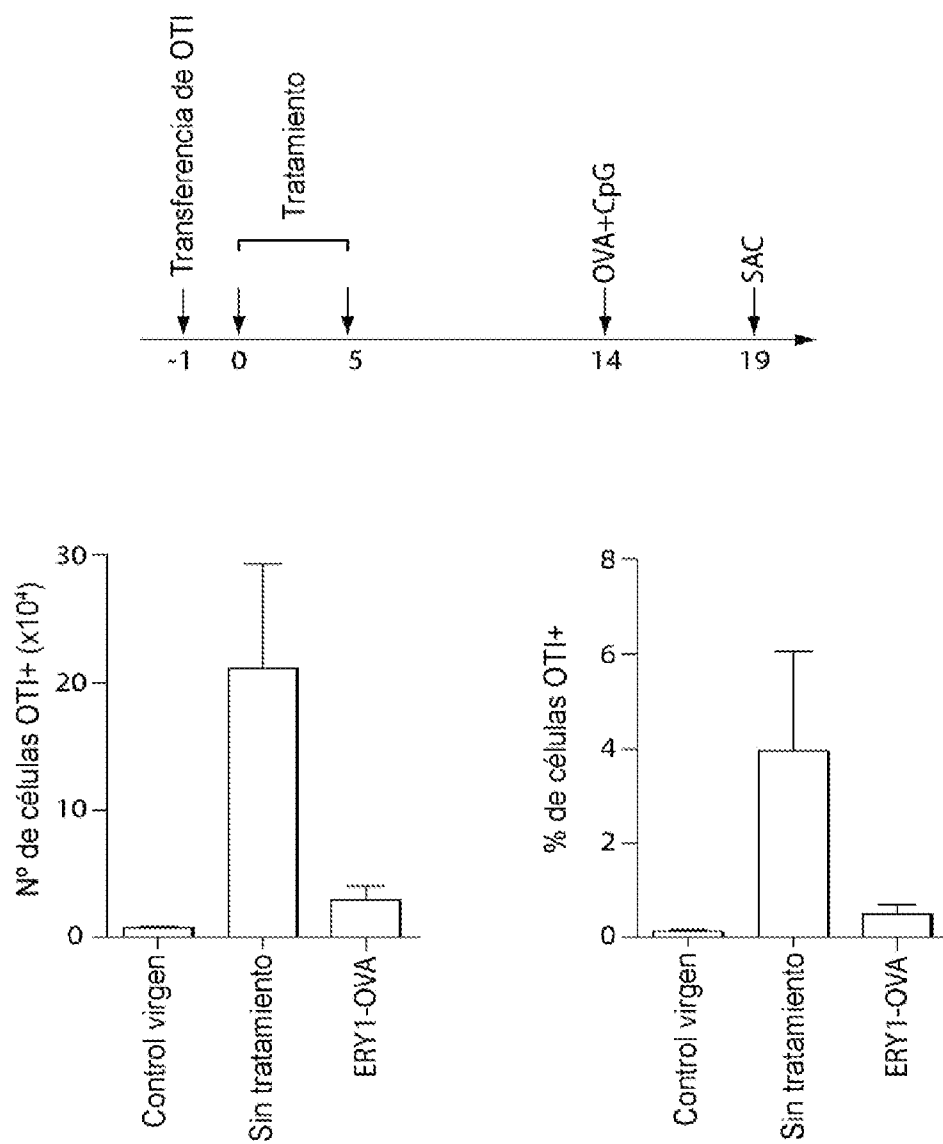


Fig. 4