

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 550**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07F 9/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2014 PCT/US2014/057234**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15048145**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2014 E 14848904 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3049103**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para reducir la inmunogenicidad específica del antígeno**

30 Prioridad:

24.09.2013 US 201361881857 P

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

23.02.2021

73 Titular/es:

**THE RESEARCH FOUNDATION FOR THE STATE
UNIVERSITY OF NEW YORK (100.0%)
University At Buffalo, Office Of Science,
Technology Transfer And Economic, Outreach
Baird Research Park, 1576 Sweet Home Road,
Suite 111
Amherst, NY 14228-2567, US**

72 Inventor/es:

**BALU-IYER, SATHY;
KOSLOSKI, MATTHEW P.;
SHETTY, KRITHIKA ARUN;
SCHNEIDER, JENNIFER, LEIGH y
FATHALLAH, ANAS**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 807 550 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para reducir la inmunogenicidad específica del antígeno

Declaración con respecto a la investigación patrocinada por el gobierno federal

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo el contrato HL-70227 otorgado por los National Institutes of Health. El gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

Campo de divulgación

Esta divulgación se refiere generalmente al campo de la inmunogenicidad de las proteínas antigénicas. Más particularmente, esta divulgación se refiere a composiciones y procedimientos para: (i) reducir la inmunogenicidad, (ii) mejorar la farmacocinética, y (iii) la inducción de tolerancia a bioterapéuticos, incluyendo proteínas terapéuticas, péptidos y anticuerpos.

Antecedentes de la divulgación

La bioterapéutica, que incluye proteínas recombinantes, péptidos y anticuerpos, representa una clase creciente de agentes farmacéuticos. Esta clase ya se está utilizando para tratar un amplio intervalo de enfermedades. Si bien los tratamientos que usan estos agentes pueden ser altamente efectivos, tales tratamientos a menudo encuentran problemas relacionados con la estabilidad y la inmunogenicidad. No es raro que las proteínas terapéuticas formen agregados, en los que las proteínas terapéuticas desplegadas se asocian entre sí y forman complejos que pueden conducir a respuestas inmunes no deseadas. Igualmente, si no más, preocupante es la inmunogenicidad inherente de tales terapias que a menudo conduce a respuestas inmunes basadas en anticuerpos que impactan su seguridad y eficacia. Por ejemplo, las respuestas inmunitarias basadas en anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos antifármacos) no solo pueden alterar la farmacocinética (por ejemplo, aumentar la tasa de depuración/tiempo de circulación reducido) sino también anular la actividad farmacológica de la proteína. Esto último ocurre cuando la respuesta inmune basada en anticuerpos implica el desarrollo de anticuerpos neutralizantes. Con el tiempo, a medida que aumentan los títulos de los anticuerpos neutralizantes, la terapia se vuelve menos efectiva y puede conducir a morbilidades adicionales y, a veces, incluso a la mortalidad, especialmente en los casos en que no existen terapias alternativas.

La "inmunogenicidad" de un bioterapéutico está influenciada por diversos factores, que incluyen la ruta de administración, los medicamentos concomitantes, las dosis de fármacos y el tratamiento programado, la genética, la edad, el sexo, el estado inmune y nutricional, las características de la enfermedad, el tamaño y la estructura del fármaco, que tan "humano" es el fármaco, la tasa de eliminación de los complejos inmunes y la solubilidad del fármaco. Debido a que hay muchos factores que inducen la inmunogenicidad, puede haber un amplio intervalo de "inmunogenicidades" para un bioterapéutico particular entre diferentes estudios.

Existen numerosos ejemplos para el desarrollo de anticuerpos antifármacos contra bioterapéuticos. Muchos ejemplos implican anticuerpos monoclonales, que pueden incluir anticuerpos quiméricos, humanizados e incluso completamente humanos. Un ejemplo específico son las terapias biológicas del factor de necrosis antitumoral (anti-TNF) tales como adalimumab (Humira®) e infliximab (Remicade®), que se usan para tratar enfermedades autoinmunes. La formación de anticuerpos antifármacos se reconoce como el mecanismo que explica el fracaso de los bioterapéuticos anti-TNF en el tratamiento de la artritis reumatoide ("RA"). Los anticuerpos antifármacos desarrollados contra las terapias anti-TNF reducen la efectividad clínica de estas terapias y requieren una mayor dosificación o interrupción. Los anticuerpos neutralizantes causan que del 12 % al 44 % de los pacientes con RA desarrollen resistencia o reacciones adversas a los agentes anti-TNF. Debido a la formación de anticuerpos antifármacos, al menos 1/3 de los pacientes con RA no responden al tratamiento o pierden la capacidad de respuesta inicial. Cada uno de los bioterapéuticos anti-TNF comercializados actualmente (Remicade® (infliximab), Humira® (adalimumab), Simponi® (golimumab), Enbrel® (etanercept) y Cimzia® (certolizumab PEGilado) tiene un intervalo respectivo de "inmunogenicidad".

Otros ejemplos incluyen terapias de reemplazo basadas en proteínas, que incluyen, pero no se limitan a terapias de reemplazo (por ejemplo, Factor VIII) para trastornos de la coagulación tales como la hemofilia y terapias de reemplazo enzimático para enfermedades de almacenamiento lisosómico tal como la enfermedad de Pompe. En un ejemplo específico, los pacientes que padecen la enfermedad de Pompe poseen una deficiencia en la enzima alfa glucosidasa ácida ("GAA"). El tratamiento actual para la enfermedad es la terapia de reemplazo enzimático con alglucosidasa alfa, que se comercializa como Myozyme® y Lumizyme®. Al igual que los bioterapéuticos anti-TNF mencionados anteriormente, estos fármacos son inmunogénicos, a menudo dan como resultado respuestas inmunes indeseables que finalmente hacen que la terapia sea menos efectiva o incluso ineficaz.

Se han utilizado y/o investigado varios enfoques para minimizar la inmunogenicidad de los bioterapéuticos, incluidos, pero no limitados a el desarrollo de formulaciones menos inmunogénicas, la modificación de los regímenes de tratamiento, el uso de esteroides (es decir, inmunosupresión generalizada) y varios enfoques de administración. Cada enfoque tiene su propio conjunto de inconvenientes y limitaciones.

Además de la inmunogenicidad, otra preocupación que enfrentan las rutas subcutáneas de administración de bioterapéuticos es su biodisponibilidad incompleta, que probablemente se deba, en parte, a la degradación del bioterapéutico en o cerca del sitio de inyección.

5 Por lo tanto, es deseable un enfoque seguro y efectivo para minimizar la inmunogenicidad, mejorar la farmacocinética e inducir la tolerancia inmune específica del antígeno.

10 Anas M. Fathallah et al: "Immunogenicity and pharmacokinetics of subcutaneously administered large proteins", mid-atlantic graduate student symposium in medicinal chemistry, Pharmacognosy and pharmaceutical science (MAGSS 2013), Ohio State University, Columbus, Ohio, June 9 - 11, 2013, Ohio State University divulga que la administración de proteínas grandes a través de la ruta sc con agentes moduladores tales como OPLS puede reducir la inmunogenicidad.

Miclea Razvan D et al: "O-phospho-L-serine, multi-functional excipient for B domain deleted recombinant factor VIII", The AAPS Journal, Springer-Verlag, Nueva York, vol. 9, no. 2, 1 de enero de 1901 (1901-01-01), páginas E251-E259 divulga que la interacción molecular específica de BDDrFVIII se produce con OPLS, lo que da como resultado una menor agregación de proteínas y menos inmunogenicidad.

15 Puneet Gaitonde et al: "Intravenous administration of Factor VIII-O-Phospho-L-serine (OPLS) complex reduces immunogenicity and preserves pharmacokinetics of the therapeutic protein", European Journal of pharmaceutical sciences., vol. 66, 1 de enero de 2015 (01-01-2015), páginas 157 a 162 investiga la respuesta inmune del FVIII y la farmacocinética en la administración tras la administración intravenosa del complejo FVIII-OPLS.

20 Purohit et al: "Lower inhibitor development in Hemophilia A Mice following administration of Recombinant Factor VIII-O-Phospho-L-serine Complex", J. BIO. CHEM, vol. 280, 2005, páginas 17593 - 17600 investiga la hipótesis de que la complejación de O-fosfo-1-serina, el grupo principal de fosfatidilserina, con el dominio C2 puede reducir la inmunogenicidad general del factor VIII.

25 Fathallah et al.: "Immunogenicity of subcutaneously administered therapeutic proteins a mechanistic perspective", The AAPS Journal, vol. 15, no. 4, 16 de julio de 2013, páginas 897 a 900 divulga una perspectiva mecanicista de la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas administradas a través de la ruta sc y discuten estrategias y oportunidades para novedosos enfoques terapéuticos para mitigar la inmunogenicidad.

Resumen de la divulgación

30 La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas Las realizaciones y/o ejemplos de la siguiente descripción que no están cubiertos por las reivindicaciones adjuntas no se consideran parte de la presente invención. De acuerdo con aspectos de la invención, se proporcionan composiciones para su uso en un procedimiento para inducir tolerancia inmune de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación describe procedimientos y composiciones para reducir la inmunogenicidad de los antígenos (por ejemplo, bioterapéuticos), que mejoran sus propiedades farmacocinéticas e inducen tolerancia inmunológica específica a tales antígenos.

35 Esta presente divulgación se basa en la observación sorprendente de que la administración concomitante o secuencial de ciertas partículas lipídicas u OPLS y antígenos, incluso en ausencia de asociación del antígeno con OPLS o la incorporación del antígeno en partículas lipídicas (y/o blindaje de epítopos inmunogénicos) (es decir, formación de complejos), da como resultado tanto la hiporrespuesta inmunológica contra el antígeno como una mejora en sus propiedades farmacocinéticas. Esto es especialmente sorprendente teniendo en cuenta que la reducción en la inmunogenicidad se observa incluso cuando la administración se realiza por vía subcutánea, que se cree que es altamente inmunogénica debido a la presencia de un gran número de células dendríticas (es decir, una alta exposición inmunológica).

40 La tolerancia inmunológica puede verse como una continuidad que va desde la hiporrespuesta inmunológica a la falta de respuesta a un antígeno. Para fines terapéuticos, generalmente se prefiere que la tolerancia inmunológica sea específica del antígeno en cuestión para evitar complicaciones que surgen de la inmunosupresión generalizada. En el contexto de esta divulgación, la "tolerancia inmunológica" a un antígeno se evidencia por una cualquiera o combinación de lo siguiente: (a) aumento en uno o más de los siguientes: (i) células reguladoras T, (ii) TGF- β , y/o (iii) IL-10, y/o (b) disminución en uno o más de los siguientes: (i) títulos de anticuerpos específicos del antígeno, (ii) células B, incluidas células B de memoria específica del antígeno, (iii) IL-6, (iv) IL-17, (v) CD40, (vi) CD80 y/o (vii) CD86, y/o (c) hiporrespuesta después de una reexposición con el antígeno. Uno o más de estos identificadores se pueden evaluar en condiciones de cultivo. Por "específico" se entiende que no se ve afectada una respuesta inmune a antígenos no relevantes (antígenos que no fueron complejados a o coadministrados, ya sea concomitantemente o secuencialmente, con las composiciones lipídicas de la presente divulgación).

55 En un aspecto, esta divulgación proporciona un procedimiento para inducir tolerancia inmune a agentes (tales como agentes terapéuticos). Los agentes se administran junto con la administración de OPLS. En una realización, el agente y OPLS se administran como composiciones separadas. Las administraciones pueden llevarse a cabo al

mismo tiempo (concomitantemente) o pueden llevarse a cabo una tras otra (secuencialmente). En una realización, la OPLS y el agente pueden combinarse antes de la administración, pero la asociación de la OPLS y el agente es baja o ausente (es decir, indetectable).

5 En una realización, la biodisponibilidad de los bioterapéuticos se aumenta al mejorar la absorción linfática después de la administración sc. Si bien los agentes (por ejemplo, la albúmina) que actúan como expansores de volumen se han explorado en el pasado, estos agentes no tienen la capacidad de reducir la inmunogenicidad del agente biológico coadministrado. En la presente divulgación, se observó que la administración de un agente biológico en un tampón hipertónico podría aumentar la biodisponibilidad, así como inducir tolerancia inmune.

10 En una realización, el agente terapéutico se administra junto con OPLS a una dosis subterapéutica. A esta dosis, el agente terapéutico no ejerce un efecto clínicamente relevante para la indicación a la que está destinado. Sin embargo, como se describe en esta divulgación, sorprendentemente, es capaz de inducir tolerancia inmune específica hacia el agente. El agente terapéutico y OPLS puede administrarse en la misma composición o puede administrarse por separado (concomitante o secuencialmente).

15 En una realización, el antígeno (tal como un agente terapéutico) se administra junto con OPLS (como una formulación única, o formulaciones separadas - ya sea administradas concomitantemente o secuencialmente), en la que el agente está en una dosis terapéutica. En una realización, si se administra como una formulación única, la OPLS y el agente están unidos libremente (K_d de más de 10 μM y hasta 500 μM) o no unidos (K_d de más de 500 μM). En una realización, si se administra como una formulación única, el agente y OPLS se combinan inmediatamente antes de la administración para que no haya complejación detectable de la OPLS y el antígeno.

20 En una realización, la administración del agente y OPLS se realiza por vía cutánea. La ruta cutánea puede ser una inyección subcutánea, administración transdérmica o intradérmica, aplicación tópica o cualquier otro procedimiento de administración a través de la piel.

25 En un aspecto, esta divulgación proporciona un procedimiento para inducir tolerancia inmune por exposición *ex vivo* a un antígeno terapéutico y OPLS. El procedimiento comprende obtener células dendríticas de un individuo, poner en contacto las células dendríticas *in vitro* con OPLS y el antígeno, y devolver las células dendríticas al huésped.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona kits para inducir tolerancia inmune. Los kits comprenden uno o más de los siguientes: OPLS u otras formulaciones lipídicas que contienen serina, agentes terapéuticos, tampón hipertónico, dispositivos y agentes de administración, instrucciones para la administración de las diversas composiciones.

30 Breve descripción de las figuras.

Figura 1. Efecto de OPLS en el perfil de citoquinas de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC). Las concentraciones de TGF- β , TNF- α e IL-6 se muestran en función de la concentración de OPLS.

35 Figura 2. Unión de OPLS a bioterapéuticos. Las constantes de disociación (K_d) varían de 8,4 μM para FVIII (unión fuerte) a 2573 μM para OVA (esencialmente sin unión).

Figura 3. Títulos de anticuerpos murinos después de la coadministración subcutánea de FVIII y OPLS (0,4 mg/5 UI y 5 mg/5 UI) versus FVIII solo (5 UI). La OPLS y el FVIII se combinaron justo antes de la administración a temperatura ambiente y no hubo complejos detectables de antígeno y OPLS.

40 Figura 4. Bioactividad promedio del FVIII (plasma) en función del tiempo después de la administración intravenosa en ratones.

Figura 5 (A) Concentraciones plasmáticas y (B) concentraciones linfáticas después de la administración subcutánea de FVIII y OPLS-FVIII en ratones.

45 Figura 6. Niveles de titulación de anticuerpos murinos después de la administración subcutánea de proteína versus coadministración subcutánea de proteína y lípidos. (a) administración de ovoalbúmina versus coadministración de ovoalbúmina y 5 mg de OPLS, (b) administración de FVIII versus coadministración de FVIII y OPLS a diversas concentraciones, (c) administración de proteína alfa glucosidasa ácida (GAA) versus coadministración de proteína GAA y bien sea O-Fosfo-D-Serina ("OPDS") u OPLS, (d) administración de Humira® (adalimumab) versus coadministración de Humira® (adalimumab) y 5 mg de OPLS.

50 Figura 7. Títulos de anticuerpos murinos después de la coadministración subcutánea de IgG humana y OPLS (0,4 mg/1ug) versus administración subcutánea de IgG sola. Al igual que en la Figura 7, se esperan mayores efectos con una dosis de OPLS igual o superior a 5 mg. La IgG humana en este ejemplo es un aislado de IgG en plasma humano.

Figura 8. Títulos de anticuerpos murinos después de la coadministración subcutánea de rituximab (RXT) y OPLS (0,4 mg/1ug y 5 mg/1ug) versus administración subcutánea de rituximab solo.

Figura 9. Títulos de anticuerpos murinos después de la administración subcutánea de péptido alfa glucosidasa ácida (GAA) (SEQ: YIFLGPEPKSVVQ) versus coadministración subcutánea de péptido GAA y bien sea liposomas PS (1:10,000 como se describe a continuación) o 5 mg de OPLS. Nótese que el péptido GAA es el epítipo de células T más destacado de GAA de longitud completa (Molecular Genetics and Metabolism, 2012. 106 (2): p. 189-195).

Figura 10. Niveles de título de anticuerpos murinos después de la administración subcutánea de proteína GAA versus coadministración subcutánea de proteína GAA y lípidos. Los lípidos utilizados fueron liposomas PS (PS/PC) y PG30.

Figura 11. Tolerancia específica a FVIII/hiporrespuesta utilizando O-Fosfo-L-Serina (aquí en lo sucesivo denominado como "OPLS"). (a) La línea de base muestra la comparación de títulos de anticuerpos anti-FVIII murinos después de la coadministración subcutánea de: (i) FVIII y OPLS, (ii) FVIII y O-Fosfo-D-Serina (aquí en lo sucesivo denominado como "OPDS"), (iii) FVIII y Dexametasona ("Dex"), en comparación con la administración de FVIII solo. (b) El nuevo reto muestra una comparación de los títulos de anticuerpos anti-FVIII murinos en cada grupo después de una reexposición subcutánea con FVIII libre. La coadministración (s.c.) de FVIII con OPLS condujo a una hiporrespuesta específica del antígeno-(FVIII-) tras la reexposición, mientras que la coadministración (s.c.) de FVIII con OPDS o Dexametasona, un inmunosupresor general, no.

Figura 12. Tolerancia específica a FVIII/hiporrespuesta usando PS-liposomas. (a) Títulos de anticuerpos neutralizantes anti-FVIII murinos después de la vacunación reversa con diversas composiciones lipídicas (fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG)) en comparación con FVIII libre y FVIII más dexametasona (Dex); (b) Títulos murinos de anti-ovoalbúmina (Ova) en cada grupo después de la reexposición con Ova para mostrar que los ratones responden normalmente a Ova después del procedimiento de vacunación reversa.

Figura 13. Títulos anti GAA para animales tratados con GAA y GAA más OPLS después de la reexposición de GAA.

Figura 14. Títulos anti GAA para animales tratados con GAA y GAA más OPLS después de que los datos de tolerancia a GAA por reexposición a GAA con liposomas de PS.

Figura 15. Datos de tolerancia a Humira® (adalimumab) con liposomas PS. Los modelos murinos se sometieron a (a) Humira libre y (b) Humira con liposomas de fosfatidilserina (PS). Después de la exposición respectiva a (a) Humira libre y (b) Humira con liposomas PS, los modelos se reexpusieron con Humira libre y se midieron los títulos inmunológicos en Unidades Arbitrarias. Aquellos que se sometieron originalmente a un régimen con Humira y liposomas PS produjeron un título inmunológico reducido estadísticamente significativo que aquellos que originalmente se sometieron solamente a Humira de forma libre.

Figura 16. La administración del Factor VIII con liposomas PS induce la sobrerregulación de células T reguladoras CD4+FoxP3+. Los grupos experimentales se administraron bien sea a (a) Factor VIII libre o (b) Factor VIII con liposomas PS. El grupo administrado (b) Factor VIII con liposomas PS tuvo una sobrerregulación relativa mayor estadísticamente significativa de las células reguladoras T CD4+FoxP3+ que las administradas con Factor VIII de forma libre

Figura 17. Papel de las células B de memoria en la hiporrespuesta mediada por PS. Los ratones que recibieron células B de memoria de ratones donantes tratados con PS-FVIII exhibieron títulos de anticuerpos anti-FVIII significativamente reducidos.

Figura 18. Datos de título neutralizante de ratones que habían recibido un enfoque de inducción de tolerancia de cuatro semanas en el que el antígeno y las partículas lipídicas se administran distales entre sí, seguidas de cuatro semanas de reexposición de FVIII libre.

Figura 19. Datos totales del título anti-FVIII para ratones sometidos a un enfoque de inducción de tolerancia en el que el antígeno y las partículas lipídicas se administran distales entre sí.

Figura 20. Niveles de título de IgG anti-KLH obtenidos de un estudio TDAR de dosis repetidas a corto plazo (28 dosis diarias) realizado en ratones CD-1. No se encontró significación estadística entre los niveles medios de título de ningún grupo tratado con OPLS y el grupo tratado con vehículo. Los datos indican que incluso con la dosis más alta evaluada, OPLS no altera el estado de competencia inmune general de los animales.

Figura 21. Efecto de 28 inyecciones diarias de un intervalo de dosis de OPLS en marcadores de química plasmática de ratones CD-1. Se recolectaron muestras de animales 1 día después de la finalización de la dosificación. Los datos indican que no hay impacto de la dosis de OPLS dada en la función renal y hepática incluso con la dosis más alta evaluada de OPLS.

Figura 22. Niveles de actividad de creatina quinasa en plasma (CK: una enzima con alta expresión en los miocitos, la elevación de la CK en plasma es una indicación de daño al tejido muscular) después de 28 inyecciones s.c. diarias de OPLS a ratones CD-1. No se observó ninguna patología visible en el sitio de inyección durante las evaluaciones macroscópicas del tejido del sitio de inyección tras la necropsia en ninguno de los grupos tratados con OPLS. No se encontró significación estadística entre los niveles medios de actividad de CK en plasma de ningún grupo tratado con OPLS y el grupo tratado con vehículo. Los datos indican que incluso con la dosis más alta evaluada, OPLS no causa degradación muscular en el sitio de inyección.

Figura 23. Efecto de 21 dosis diarias de 25 mg/kg de OPLS en subconjuntos de linfocitos en sangre periférica de macacos rhesus. Se tomaron muestras de los animales en la línea base (día 0), en un punto de tiempo intermedio durante el tratamiento (día 8) y 1 día después de la finalización de la dosificación (día 22) y se inmunofenotiparon usando citometría de flujo. Con la excepción de un aumento transitorio en el % de células B, no se observaron cambios significativos entre los niveles de línea base y posteriores al tratamiento. (* valor $p < 0,05$). Los datos indican que OPLS no altera el estado de inmunocompetencia general de los animales a la dosis dada.

Figura 24. Efecto de 21 dosis diarias de 25 mg/kg de OPLS sobre los marcadores de química plasmática de los macacos rhesus. Se tomaron muestras de los animales en la línea base (día 0), en un punto intermedio durante el tratamiento (día 8) y 1 día después de la finalización de la dosificación (día 22). Los datos indican que no hay impacto de la dosis de OPLS dada en la función renal y hepática.

Figura 25. Tabla que proporciona la relación molar de proteína a OPLS.

Figura 26. Semana 6- Muestreo safeno después de la administración de composiciones separadas de OPLS y GAA.

Figura 27. Después de Reexposición - Muestreo terminal- Semana 11.

Figura 28. Comparación de la semana 6 a la semana 11.

Figura 29: Perfil de concentración-tiempo en plasma (símbolos abiertos) y nodos linfáticos (símbolos cerrados) de rituximab después de la administración iv (círculos abiertos) y sc (diamantes abiertos) en ratones SW. Se inyectó 1 $\mu\text{g/g}$ de rituximab sc o iv y las concentraciones plasmáticas se monitorizaron durante 120 horas. La línea continua representa el ajuste de los datos iv a un modelo de 2 compartimentos y la línea discontinua representa el ajuste de los datos sc a un modelo. Los diamantes cerrados representan la concentración de rituximab en los nodos linfáticos inguinales después de la administración sc. Valores presentados como media \pm SD.

Figura 30. Perfil de concentración-tiempo en plasma (símbolos abiertos) y nodos linfáticos (símbolos cerrados) de rituximab administrado sc en tampón isotónico (tampón A diamantes abiertos) y tampón hipertónico (tampón B triángulo invertido abierto). Concentración de rituximab en nodos linfáticos administrado sc en tampón isotónico (tampón A diamantes cerrados) y tampón hipertónico (tampón B cerrado triángulos invertidos). Valores presentados como media \pm SD. Las líneas continuas representan el ajuste de los datos al modelo que se muestra en la figura 2. Estos datos muestran un aumento de la exposición a plasma y nodos linfáticos después de la administración sc de rituximab en tampón hipertónico en comparación con el tampón isotónico.

Figura 31. Perfil de concentración-tiempo en plasma (símbolos abiertos) y nodos linfáticos (símbolos cerrados) de rituximab administrado sc en diferentes tampones hipertónicos. 5.A Los tampones C y E representan dosis bajas y altas de OPLS (caja abierta de 20 mM) y 270 mM (triángulo invertido abierto) en comparación con el tampón hipertónico que contiene NaCl solamente (tampón B círculos abiertos), con las concentraciones correspondientes de rituximab en los nodos linfáticos para los tampones C y E (caja cerrada y triángulo invertido cerrado respectivamente) en comparación con el tampón hipertónico que contiene NaCl solamente (tampón B círculos cerrados). Valores presentados como media + SD. Las líneas continuas representan el ajuste de los datos a un modelo. Los datos muestran un aumento de la concentración plasmática para rituximab administrado con OPLS de una manera dependiente de la dosis. Esto también corresponde al aumento de la exposición de los nodos linfáticos, especialmente para el tampón E. El modelo predice una biodisponibilidad casi completa para el tampón E. 5.B Los tampones D y F representan dosis bajas y altas de manitol (caja abierta de 20 mM) y 270 mM (triángulo invertido abierto) en comparación con el tampón hipertónico que contiene NaCl solamente (tampón B círculos abiertos) con las concentraciones correspondientes de rituximab en los nodos linfáticos para los tampones D y F (caja cerrada y triángulo invertido cerrado respectivamente) en comparación con el tampón hipertónico que contiene NaCl solamente (tampón B círculos cerrados). Valores presentados como media + SD. Las líneas continuas representan el ajuste de los datos a un modelo. Los datos muestran un aumento de la concentración plasmática de rituximab administrado con manitol. Esto también corresponde a aumentar la exposición a los nodos linfáticos. El modelo predice una biodisponibilidad casi completa para los tampones D y F.

Figura 32. Títulos anti-FVIII en ratones HA reexpuestos de manera agresiva con 4 inyecciones sc semanales de FVIII. Los ratones se pretrataron con FVIII solo, FVIII/OPLS o FVIII-Dexamethasone (Dex) sc durante 4 semanas, seguido de un período de lavado de 2 semanas, después de lo cual los animales se reexpusieron con FVIII solo.

Los animales en los grupos de pretratamiento con FVIII y FVIII-Dex mostraron una respuesta de anticuerpos anti-FVIII robusta después de una reexposición. La respuesta no fue tan robusta en el grupo de pretratamiento con FVIII/OPLS.

5 Figura 33. Caracterización de BMDC expuesto a FVIII en presencia y ausencia de OPLS. Los paneles A y B muestran el efecto de OPLS 50 mM en la maduración fenotípica de BMDC. El análisis de citometría de flujo de la expresión de CD40 en BMDC expuestos a FVIII en presencia y ausencia de OPLS muestra una reducción significativa en la expresión de CD40 en el grupo de tratamiento con OPLS. Se muestra un conjunto de datos representativos en el panel superior (A), el porcentaje de células CD40+ y MFI presentados en el panel superior de 2B (n= 3 * p <0,05 prueba t de student). La expresión de MHCII en BMDC expuesta a FVIII en presencia y ausencia de OPLS 50 mM se presenta en los paneles inferiores de las figuras 33A y 33B. Los datos no muestran cambios en los niveles de expresión de MHCII en respuesta a OPLS. Los paneles C y D muestran un efecto dependiente de la dosis de OPLS en la producción de citoquinas por BMDC. Las BMDC expuestas a FVIII con dosis crecientes de OPLS mostraron una disminución dependiente de la dosis en la citoquina proinflamatoria TNF- α e IL-12p70 (panel C, n= 4). Esto fue acompañado por un aumento dependiente de la dosis en la citoquina reguladora TGF- β (panel D, n= 4). Los paneles E, F y G etiquetan la fluorescencia de BMDC y el potencial migratorio de BMDC tratados *ex vivo* con FVIII solo o con OPLS 50 mM. Etiquetado exitoso de BMDC con tinte DiIC18 (5) de grupos FVIII (panel E) o FVIII/OPLS (panel F). El área bajo la curva de fluorescencia para BMDC marcada con DiIC18 (5) se recuperó en el nodo linfático inguinal de ratones HA huésped (panel G).

20 Figura 34. OPLS acorta el potencial inmunológico de BMDC expuesto *ex vivo* a FVIII en ratones HA huésped. Anticuerpos anti-FVIII totales en ratones HA huésped después de 3 sc administración semanal de BMDC expuestos *ex vivo* a FVIII solo o FVIII/OPLS (50 mM). Los datos muestran una reducción estadísticamente significativa en los títulos anti-FVIII en el grupo tratado con OPLS. Se utilizó plasma de ratones ingenuos HA para calcular los valores de corte para ELISA.

25 Figura 35. Respuesta dependiente de la dosis *in vivo* al tratamiento con OPLS/FVIII. Los ratones HA tratados con dosis altas de OPLS (5 mg) mostraron una reducción estadísticamente significativa en los títulos anti-FVIII en comparación con FVIII solo y dosis bajas de OPLS (0,4 mg).

Descripción detallada de la divulgación.

30 La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden OPLS o partículas lipídicas que, cuando se administran en combinación con o de manera secuencial con uno o más antígenos, proporcionan una reducción en la inmunogenicidad del antígeno y una mejora en sus propiedades farmacocinéticas y/o la inducción de tolerancia inmune al antígeno.

35 Como se usa en el presente documento, el término bioterapéutico significa terapéutico de base biológica, que incluye proteínas recombinantes, péptidos, anticuerpos terapéuticos/profilácticos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) y fragmentos de los mismos. La bioterapéutica, en esta descripción, sirve como y a veces se denomina antígeno.

40 El agente (tal como un agente terapéutico) se suministra junto con un agente inductor de tolerancia inmune tal como O-Fosfo-L-Serina ("OPLS"); o partículas lipídicas que pueden ser: (a) liposomas unilamelares o multilamelares compuestos de fosfatidilserina ("PS") y uno o más fosfolípidos ("liposomas PS"); o (b) estructuras no liposomales compuestas de serina que incluyen micelas, estructuras condensadas y cocleato. OPLS está disponible comercialmente. Los fosfolípidos, incluido el PS, se pueden obtener de diversas fuentes, tanto naturales como sintéticas. Por ejemplo, la PS se puede obtener de la PS de cerebro porcino o de la PS de soja (soja) de origen vegetal. PC y PS de huevo y PC sintética también están disponibles comercialmente. El término composiciones lipídicas incluye OPLS así como partículas lipídicas.

45 La presente divulgación proporciona composiciones y procedimientos para mejorar las propiedades farmacocinéticas (PK). En una realización, una "mejora" en las propiedades farmacocinéticas significa una vida media mejorada o biodisponibilidad para el antígeno. Por ejemplo, cuando OPLS o las composiciones lipídicas se administraron por vía subcutánea con un antígeno (tal como el Factor VIII), hubo una mejora en la captación linfática y el perfil de PK en plasma con respecto a una administración de la proteína libre administrada por vía subcutánea. También se observó una mejora en la absorción linfática y las concentraciones plasmáticas cuando se usa Rituximab como el antígeno, lo que proporciona evidencia adicional de que este es un enfoque ampliamente aplicable.

50 En una realización, el agente inductor de tolerancia inmune comprende, consiste esencialmente en, o consiste en OPLS. En una realización, el único agente inductor de tolerancia inmune en la composición lipídica es OPLS. La concentración de OPLS puede ser de 1 mM a 100 mM, incluidos todos los enteros e intervalos entre ellos. En una realización, la cantidad de OPLS es de 100 a 300 nM incluyendo todos los enteros e intervalos entre ellos. En una realización, la concentración mM es 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100. En En otra realización, la concentración de OPLS está entre 21 mM y 100 mM incluyendo todos los enteros entre ellos. En otra realización, está entre 25 mM y 75 mM incluyendo todos los enteros entre ellos. En otra realización, la concentración de OPLS está entre 35 mM y 65 mM incluyendo todos los enteros entre ellos. En aún otra realización,

la concentración de OPLS está entre 45 mM y 55 mM incluyendo todos los enteros entre ellos. En un ejemplo, la concentración de OPLS es 50 mM. En una realización, la OPLS es 125, 150, 175, 200, 225, 250 o 275 mM. Alternativamente, la cantidad de OPLS requerida para practicar los procedimientos divulgados aquí puede describirse en términos de dosis. La dosis puede ser cualquier cantidad superior a 1 mg. En una realización, la dosis de OPLS puede ser de 1 mg a 1,000 mg incluyendo todos los enteros entre ellos. En un ejemplo particular, la dosis es de 5 mg.

En general, se puede usar cualquier tampón adecuado. Por ejemplo, se puede usar cualquier tampón fosfato (incluyendo solución salina tamponada con fosfato) o tampón TRIS. En una realización, se utiliza el medio de reconstitución descrito en la patente U.S. 8.349.794. El pH del tampón puede ser de 5 a 8. En una realización, el pH del tampón puede ser de 5,5 a 8 o de 5,5 a 7,6, o de 6,0 a 7,6. En otra realización, el pH del tampón puede ser de 6 a 8, o de 7,2 a 7,6 o 7,4.

En una realización, el procedimiento para mejorar la absorción linfática y/o las concentraciones plasmáticas de un antígeno administrado de forma concomitante o secuencial se logra mediante el uso de una solución hipertónica que comprende OPLS. En una realización, las composiciones comprenden OPLS y NaCl. En una realización, las composiciones comprenden OPLS y manitol, y opcionalmente, NaCl. El aumento de la osmolalidad se puede lograr mediante cualquier combinación de cualquier cantidad de uno o más de OPLS, manitol y NaCl.

En otra realización, el procedimiento para mejorar la absorción linfática y/o las concentraciones plasmáticas de un antígeno administrado de forma concomitante o secuencial se logra mediante el uso de una solución hipertónica (definida aquí como que tiene una osmolalidad de más de 300 mmol/kg) que comprende al menos uno de: OPLS y manitol. En una realización, la osmolalidad de la solución varía entre 300 mmol/kg y 1,100 mmol/kg, incluidos todos los enteros y los intervalos entre ellos. En una realización, la osmolalidad de la solución varía entre 300 mmol/kg y 800 mmol/kg, incluidos todos los enteros entre ellos. En una realización, la osmolalidad es de 301 a 1.100 mmol/kg o de 500-600 mmol/kg. En una realización, la osmolalidad es de 290 a 300 mmol/kg (incluyendo todos los enteros e intervalos entre ellos). En realizaciones específicas para soluciones hipertónicas que comprenden OPLS, en las que la osmolalidad de la solución varía entre 300 mmol/kg y 1.100 mmol/kg, las concentraciones más altas (por ejemplo > 100 mM) de OPLS dan como resultado una mayor absorción linfática y/o concentraciones plasmáticas que reducen las concentraciones (por ejemplo, <100 mM) de OPLS. De manera similar, en realizaciones específicas para soluciones hipertónicas que comprenden manitol, en las que la osmolalidad de la solución varía entre 300 mmol/kg y 1.100 mmol/kg, las concentraciones más altas (por ejemplo > 100 mM) de manitol dan como resultado una mayor absorción linfática y/o concentraciones plasmáticas que concentraciones más bajas (por ejemplo <100 mM) de manitol.

Téngase en cuenta que aunque las composiciones lipídicas que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en O-Fosfo-D-Serina ("OPDS") se usaron en ciertos ejemplos divulgados en este documento, se observaron efectos similares a los proporcionados usando OPLS. Si bien no pretende estar ligado a teoría alguna particular, se considera que los efectos observados de OPDS, al menos en parte, se deben al hecho de que OPDS es muy inestable y que una parte de OPDS se está convirtiendo en OPLS *in vivo*.

En otra realización, las partículas lipídicas son liposomas compuestos de fosfatidilserina ("PS") y fosfatidilcolina ("PC") y, opcionalmente, colesterol (a veces denominado "PS/PC"). En una realización, los fosfolípidos en las composiciones lipídicas comprenden o consisten esencialmente en, o consisten en PS y PC presentes en la relación de 10:90 a 30:70 y todas las relaciones entre ellas. En una realización, los únicos fosfolípidos en las partículas lipídicas son PS y PC como se describió anteriormente. En algunas realizaciones, el colesterol también puede estar presente, pero no es necesario practicar los procedimientos divulgados aquí. Sin embargo, en los casos en que el antígeno se compleja (frente a la coadministración) con la partícula lipídica y se desea la liberación del antígeno, es preferible incluir 1-33 % de colesterol (porcentaje de PS y PC juntos).

En otras realizaciones, los fosfolípidos en las composiciones lipídicas comprenden o consisten esencialmente en, o consisten en PS, fosfatidilinositol ("PI") y PC y, opcionalmente, colesterol (a veces denominado como "PS/PI"). La combinación de PS y PI es preferiblemente no más de 60 % en moles y PC es al menos 40 % en moles. El componente PI de los liposomas PS/PI es de 1 % en moles a 30 % en moles y todos los valores de % en moles enteros entre ellos. Para los liposomas PS (liposomas PS/PC y PS/PI), la PS debe ser de al menos 1 % en moles. En una realización, PS es al menos 10 % en moles.

PS, PC y PI pueden tener de 0 a 22 átomos de carbono en la cadena de acilo. Por ejemplo, cuando el átomo de carbono es 0 para PS, la molécula es O-Fosfo-L-Serina (OPLS). En una realización, las cadenas de acilo tienen de 1 a 22, de 2 a 22 o de 6 a 22 carbonos (y todos los enteros de carbonos e intervalos entre ellos). Las cadenas de acilo pueden estar saturadas o insaturadas y pueden tener longitudes iguales o diferentes. Algunos ejemplos de cadenas de acilo son: ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido oleico, ácido palmitoleico, ácido linoleico y ácido araquidónico. La PC puede tener una o dos cadenas de acilo. Por ejemplo, la PC puede incluir lisofosfatidilcolina (LPC). Por ejemplo, en una realización, la composición de los liposomas de PS era PS:LPC:PC como 30:10:70 % en moles. La LPC puede ser de 0 % en moles a 20 % en moles. En una realización, es de 1 % en moles a 20 % en moles y todos los valores e intervalos de % en moles enteros varían entre ellos.

- Las partículas lipídicas de la presente divulgación pueden prepararse mediante hidratación de película lipídica delgada usando las relaciones molares apropiadas de PS, PC y, opcionalmente, colesterol; o relación apropiada de PS, PC y PI, y opcionalmente colesterol, en un tampón adecuado. Los lípidos se disuelven en cloroformo y el disolvente se seca. Las vesículas multilamelares resultantes (MLV) se extruyen a través de los filtros de tamaño deseado (dispositivo de dimensionamiento) bajo alta presión para obtener estructuras lipídicas de la presente divulgación. En una realización, el tamaño de 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 100 % (incluidos todos los porcentajes entre 50 y 100) de las partículas lipídicas es de 40 nm a 4 micrones, incluidos todos los tamaños entre ellas en el rango del nanómetro y micrómetro. En otra realización, el tamaño de las partículas es de 60 a 140 nm. En otra realización, las partículas son inferiores a 140 nm (calculadas a partir de micrografías y mediciones de dispersión dinámica de la luz) de tal manera que las partículas no se filtran en el Sistema Endotelial Reticulo (RES) de tal manera que estén disponibles para la reacción del sistema inmune. Así, en una realización, al menos el 50 % de las partículas son menores de 140 nm. Por ejemplo, las partículas son menores de 120 nm, tal como de 40 y 100 nm. En diversas realizaciones, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 100 % de las partículas son menores de 140 nm, tales como de 40 y 100 nm o de 60 a 100 nm.
- La preparación de composiciones lipídicas que comprenden, que consisten esencialmente en, o consisten en OPLS, puede ser tan simple como una preparación de tampón. La cantidad deseada de OPLS se puede pesar y agregar a cualquier tampón. El pH de dicha solución de tampón OPLS se puede ajustar a un valor deseado (tal como 7,4) utilizando procedimientos conocidos en la técnica.
- El antígeno puede ser un péptido (generalmente 50 aminoácidos o menos), un polipéptido (generalmente 100 aminoácidos o menos) o proteínas (más de 100 aminoácidos). El agente puede ser un antígeno terapéutico o puede ser un antígeno contra el cual un individuo ya está preparado, pero contra el cual se desea tolerancia inmunológica (tal como en reacciones alérgicas o situaciones de trasplante). Las proteínas o péptidos pueden ser neutros o cargados (negativa o positivamente). Tales proteínas incluyen proteínas involucradas en la cascada de coagulación de la sangre que incluyen Factor VIII (FVIII), Factor VII (FVII), Factor IX (FIX), Factor V (FV) y Factor von Willebrand (vWF), Factor von Heldebrant, activador de plasminógeno tisular, insulina, hormona del crecimiento, eritropoyetina alfa, VEG-F, Trombopoyetina, lisozima, alfa glucosidasa ácida (GAA), anticuerpos terapéuticos, incluidos anticuerpos monoclonales tal como adalimumab, proteínas de la vaina de mielina, glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), descarboxilasa de ácido glutámico 65 (GAD), receptor de insulina y similares. En una realización, el antígeno es un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo (tal como la porción Fc)." En una realización, el antígeno puede ser uno que normalmente provoca una reacción alérgica relativamente leve, tales como típicamente serían causadas por polen, caspa de animales, polvo doméstico y similares, o un antígeno que normalmente provocaría en el individuo una reacción alérgica severa, tal como componentes en el veneno de picaduras de insectos, alergenos de nueces, ciertos antibióticos y otros composiciones que pueden causar respuestas alérgicas graves en el individuo particular en cuestión o pueden ser un antígeno relevante para el trasplante.
- En algunas realizaciones, es deseable asociar (es decir, complejo) el antígeno y la composición lipídica. Para efectuar la asociación (es decir, formar un complejo) del antígeno con las estructuras lipídicas, el antígeno en un tampón adecuado se agrega a las estructuras lipídicas. El antígeno libre se separa luego de las estructuras lipídicas por procedimientos de centrifugación tales como centrifugaciones en gradiente de densidad. En diversas realizaciones, la eficiencia de asociación del antígeno con las partículas lipídicas es al menos 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 y 95 %. Si se desea, las partículas lipídicas con el antígeno asociado pueden liofilizarse para uso futuro. En una realización, las estructuras lipídicas de la presente divulgación antes de la asociación con el antígeno pueden liofilizarse y almacenarse. Cuando sea necesario, las estructuras lipídicas pueden reconstituirse y luego usarse para combinarlas con el antígeno para efectuar la asociación del antígeno con las estructuras lipídicas antes de su uso.
- En realizaciones en las que el antígeno está asociado con los liposomas PS, la asociación puede ser de tal manera que la relación molar entre el antígeno y el lípido esté entre 1:10 (antígeno:lípido) y 1:30.000 (antígeno: lípido) y todas las relaciones entre ellos. En una realización, es aproximadamente 1:10.000 (antígeno: lípido). A medida que aumenta la dosis terapéutica de un antígeno, la relación disminuye. En otras realizaciones, la relación es de aproximadamente 1:2.000 o 1:4.000 (antígeno: lípido). La relación máxima antígeno: lípido de la presente divulgación es 1:30.000. Dado que la dosificación para diferentes proteínas varía, la cantidad de dosificación requerida alterará la relación.
- En algunas realizaciones, la composición lipídica no está en complejo con el antígeno. En una realización, las partículas lipídicas de la presente divulgación antes de la administración pueden liofilizarse y almacenarse. Cuando sea necesario, las partículas lipídicas pueden reconstituirse y luego administrarse a un individuo.
- En realizaciones donde se usa OPLS, la relación molar entre el antígeno y OPLS puede ser de 1:1 a $1:1 \times 10^7$ y todas las relaciones entre ellas y todos los intervalos entre ellas. En una realización, es de 1:1 a $1:1 \times 10^6$ todas las relaciones entre ellas. En una realización, la relación de antígeno a OPLS está entre 1:1 a 1:1.000 y todas las relaciones entre ellas.
- Cuando se describe un complejo o que un antígeno y una composición lipídica están asociados (es decir, en complejo), significa que la K_d para el antígeno y la composición lipídica es inferior a 10 μM . En una realización, la K_d

es 8,4 μM . Cuando se describe que un antígeno y una composición lipídica no están en complejo, queremos decir que la K_d para el antígeno y la composición lipídica es mayor o igual a 10 μM . El rango de unido a libre es el siguiente: cuando la constante de disociación (K_d) es inferior a 10 μM , la proteína se considera unida o en complejo; donde la K_d es de 10 μM a 500 μM , la proteína se considera unida libremente con interacciones no específicas; donde la K_d es mayor o igual a 500 μM , la proteína no está unida ('libre'). En una realización, la K_d es mayor que 10 μM . En una realización, la K_d puede ser de 10 μM a 5,000 μM incluyendo todos los enteros entre ellos. En varias realizaciones, la K_d es al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 μM . En otras realizaciones, la K_d es 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 o 3000 μM .

En algunas realizaciones, al menos el 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % del antígeno está presente como unido o unido libremente a la composición lipídica (tal como OPLS). Por ejemplo, en realizaciones, una composición puede administrarse a través de una ruta cutánea, en la que la composición comprende un agente terapéutico que está unido o no unido libremente a OPLS.

En una realización, la OPLS u otra composición lipídica puede combinarse con el antígeno justo antes de la administración (tal como menos de 1 minuto o dentro de 1 a 5 minutos del tiempo de administración). En una realización, la combinación se realiza a temperatura ambiente (tal como de 20 a 26 °C y todas las temperaturas enteras entre ellas, o menos de 20 °C), justo antes de la administración, de tal manera que no haya, o que la haya insignificante, complejación de la OPLS y el antígeno. En realizaciones específicas, la OPLS y el antígeno combinados no están expuestos a una temperatura superior a 22, 23, 24, 25 o 26 °C, de tal manera que no hay oportunidad para la formación de complejos.

Las composiciones descritas en esta divulgación pueden usarse para cualquier individuo (por ejemplo, un mamífero humano o no humano). Por ejemplo, pueden administrarse a un individuo que previamente ha sido administrado y/o expuesto al antígeno pero que no ha desarrollado previamente intolerancia inmune a dicho antígeno. En aún otro ejemplo, pueden administrarse a un individuo quien previamente ha sido administrado y/o expuesto al antígeno y ha desarrollado intolerancia inmune a dicho antígeno. El individuo puede o no mostrar indicios de una intolerancia inmune reciente. También son útiles para la administración a individuos ingenuos (es decir, aquellos individuos que no han sido administrados y/o expuestos al antígeno previamente). La intolerancia inmune como se usa en este documento significa que el individuo debe tener una producción de anticuerpos medible (por procedimientos estándar tales como ELISA o ensayos de actividad). Por el contrario, la falta de intolerancia inmune significa que el individuo no tiene anticuerpos medibles. Por "administrado" o "administración" se entiende que el antígeno y las partículas lipídicas se suministran al individuo o se introducen en el cuerpo del individuo por cualquier medio o ruta de suministro, tales como intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, mucosa, subcutánea, transdérmica, intradérmica, oral o similar. En una realización, el antígeno y las partículas lipídicas se administran a través de una ruta cutánea tal como por vía subcutánea.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para reducir la inmunogenicidad y/o mejorar las propiedades farmacocinéticas de un antígeno que comprende las etapas de: a) administrar a un individuo, una composición que comprende el antígeno; y b) secuencial o concomitantemente con la administración de la composición en a), administrando al individuo una composición que comprende una o más composiciones lipídicas divulgadas aquí. En una realización, la una o más composiciones lipídicas se seleccionan del grupo que consiste en liposomas de OPLS y PS, como se define aquí. En una realización, los liposomas de PS se seleccionan del grupo que consiste en PS/PC y PS/PI, como se describe en el presente documento. En una realización, la K_d para el antígeno y la composición lipídica es mayor o igual a 10 μM . En una realización, uno o ambos de la composición lipídica y el antígeno se administran por vía cutánea.

En otras realizaciones, el procedimiento para reducir la inmunogenicidad y/o mejorar las propiedades farmacocinéticas de un antígeno puede comprender además uno o ambos de los siguientes: (i) obtener una muestra biológica del individuo y medir uno o más de los siguientes: células reguladoras T, TGF- β , IL-10, títulos de anticuerpos específicos del antígeno, células B, incluidas las células B de memoria específica del antígeno, IL-6, IL-17, CD40, CD80 y/o CD86, y/o (ii) después de la administración del antígeno y OPLS u otra composición lipídica, obtener una muestra biológica del individuo y medir uno o más de los siguientes: células reguladoras T, TGF- β , IL-10, títulos de anticuerpos específicos del antígeno, células B, incluidas las células B de memoria específica del antígeno, IL-6, IL-17, CD40, CD80 y/o CD86. En realizaciones donde se practican tanto (i) como (ii), los niveles de las células y/o biomarcadores descritos anteriormente se pueden comparar para medir la efectividad del procedimiento.

En todavía otras realizaciones, el procedimiento para reducir la inmunogenicidad y/o mejorar las propiedades farmacocinéticas de un antígeno (tal como FVIII, GAA y adalimumab) descrito anteriormente puede repetirse 1 vez por semana hasta tres o más veces por semana, ya sea indefinidamente o durante un período de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 semanas o más semanas en un esfuerzo por lograr un mayor grado de tolerancia inmune para el desarrollo. Después de un período de tiempo adecuado (tal como al menos 4 días después del último cebador), se puede administrar al individuo una segunda composición (una o más administraciones) que comprende el antígeno en forma libre, en complejo o en combinación con partículas lipídicas que tienen una composición diferente a la composición administrada previamente (la "composición de cebado"), o en complejo (covalente o no covalente) a PEG, o tensioactivos o microesferas y similares. Las estructuras lipídicas pueden incluir micelas, cocleatos,

conjuntos moleculares lipídicos y similares. En una realización, al individuo se le administra la segunda composición (que puede ser una composición terapéutica) después de 4 a 30 días, incluyendo todo el número entero de días e intervalos entre ellos, de la última administración de la composición de cebado. En una realización, al individuo se le administra la segunda composición después de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 días de la última de la última administración de la composición de cebado. Se divulgan formulaciones menos inmunogénicas en las patentes U.S. y las solicitudes de patente nos. 7.351.688; 7.875.288; 7.875.289; 7.625.584; 20090053297; PCT/US2010/041196.

La composición de fosfolípidos de las partículas lipídicas en la segunda composición (que puede ser una composición terapéutica) puede ser igual o diferente de la composición de fosfolípidos de las partículas lipídicas de la primera composición (que es una composición de cebado). El cambio en la composición de fosfolípidos puede incluir el tipo de fosfolípido o la relación de diferentes fosfolípidos. En una realización, la composición terapéutica incluye LPC y esfingosina.

En una realización, la frecuencia de administración de la composición de cebado es una vez a la semana durante cuatro semanas por vía subcutánea. En una realización, se usan al menos cuatro administraciones semanales para inducir tolerancia. Las administraciones del antígeno y las composiciones lipídicas pueden tener lugar bien sea de forma concomitante o secuencial, como se describe en el presente documento. Si es necesario, se pueden usar más dosis de antígeno en combinación o en complejo con liposomas de PS u OPLS.

Similar a la práctica actual de administrar vacunas "de refuerzo", este procedimiento puede repetirse en caso de que dicho individuo se vuelva inmunológicamente sensible con el tiempo después de exposiciones futuras a dicho antígeno.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para administrar un antígeno (a) sin inducir un aumento de células de memoria B específicas del antígeno o (b) que reduce el número de células de memoria B específicas del antígeno en un individuo que comprende la etapa de administrar al individuo un antígeno y una o más composiciones lipídicas. En una realización, el antígeno y/o la composición lipídica se administran por vía cutánea. Por ejemplo, uno o ambos de OPLS y las composiciones de antígeno pueden administrarse por vía subcutánea, intradérmica o transdérmica, y/o por vía tópica. En una realización, la una o más composiciones lipídicas se seleccionan del grupo que consiste en liposomas de OPLS y PS. En una realización, los liposomas de PS se seleccionan del grupo que consiste en PS/PC y PS/PI, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el antígeno y la una o más composiciones lipídicas están presentes en la misma formulación. En otras realizaciones, el antígeno y la una o más composiciones lipídicas están presentes en diferentes formulaciones. En las realizaciones donde el antígeno y la una o más composiciones lipídicas están presentes en la misma formulación, la K_d para el antígeno y la una o más composiciones lipídicas es mayor o igual a 10 μ M. La administración de la composición lipídica y el antígeno puede tener lugar bien sea de forma concomitante o por separado.

En realizaciones en las que el antígeno y las composiciones lipídicas se administran concomitantemente, la composición lipídica y el antígeno pueden estar presentes dentro de la misma formulación o dentro de formulaciones diferentes.

En realizaciones donde el antígeno y la composición lipídica están presentes dentro de la misma formulación, pueden estar complejados o no complejados. En una realización, el antígeno y el componente lipídico (tal como OPLS) se unen libremente o no se unen).

En las realizaciones en las que el antígeno y las composiciones lipídicas se administran secuencialmente, el antígeno o la composición lipídica pueden administrarse primero siempre que el componente que se administre en segundo lugar se administre muy cerca del primero, tanto en términos de espacio como de tiempo, para permitir que se presenten juntos. La secuencia de administración es irrelevante. En una realización, el antígeno y la composición lipídica se administran en sitios anatómicos que están a menos de 5,08 centímetros de distancia entre sí. La administración del segundo componente se puede llevar a cabo dentro de 1,27, 2,54, 3,81 o 5,08 centímetros del sitio de administración del primer componente. En una realización, el antígeno y la composición lipídica se administran dentro de las 24 horas una de la otra. La administración del segundo componente puede llevarse a cabo dentro de 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 120, 240, 300, 480, 600, 720, 1080 o 1440 minutos desde el momento en que se administra el primer componente. En una realización preferida, se administran a través de las mismas o similares rutas cutáneas. Por ejemplo, tanto administrados por vía subcutánea como el antígeno administrado por vía subcutánea y la composición lipídica administrada por vía transdérmica.

En una realización, el antígeno (por ejemplo, proteína, péptido o polipéptido) se administra por vía subcutánea (tal como por inyección subcutánea) y OPLS se administra al mismo sitio o cercano por vía tópica. Para el suministro tópico o transdérmico, OPLS se puede mezclar bajo condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con conservantes, tampones o propelentes adecuados. Las formulaciones tópicas también pueden contener excipientes adicionales, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden ser líquidos, emulsiones, aerosoles o espumas. Las formulaciones también pueden contener excipientes adicionales tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de

- aluminio, silicatos de calcio y poliamida en polvo, o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles o espumas pueden contener adicionalmente propelentes habituales, tales como clorofluorohidrocarbonos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tal como butano y propano. En una realización, se pueden usar parches dérmicos. Estos tienen la ventaja adicional de proporcionar un suministro controlado al sitio. Tales formas de dosificación pueden hacerse disolviendo o dispersando OPLS en un medio adecuado y aplicando la formulación a una porción del parche. Los potenciadores de la absorción se pueden usar para aumentar el flujo de OPLS dentro y a través de la piel. La tasa de tal flujo puede controlarse bien sea proporcionando una membrana de control de la tasa o dispersando el ingrediente activo en una matriz polimérica o de gel. En una realización, las composiciones de OPLS se aplican a parches dérmicos, vendajes, vendajes adhesivos, medidores u otros materiales similares que se pueden aplicar directamente al área deseada. Una porción del parche dérmico (tal como un vendaje adhesivo) en el que está presente la composición de OPLS puede protegerse mediante un recubrimiento sellado y removible hasta su uso. Las superficies adhesivas también pueden estar protegidas por el mismo o diferente recubrimiento removible. En el momento del uso, se puede quitar el recubrimiento o los recubrimientos y aplicar la tira o parche en el área donde se desea el suministro de OPLS a la piel o a través de ella.
- En un aspecto de la divulgación, se proporcionan kits útiles para reducir la inmunogenicidad de un antígeno, o mejorar las propiedades farmacocinéticas de un antígeno, o reducir el número de células de memoria B específicas del antígeno. En una realización, el kit comprende OPLS e instrucciones para la administración de OPLS junto con un antígeno, y opcionalmente, dispositivos de administración para la administración de OPLS y/o el antígeno. El kit también puede comprender opcionalmente uno o más antígenos. Las instrucciones para la administración de OPLS y el antígeno pueden indicar que estos deben administrarse por vía cutánea. Las instrucciones también pueden indicar el sitio de administración y la separación temporal o espacial de las administraciones. En una realización, las instrucciones también pueden indicar que la OPLS y el antígeno se pueden combinar justo antes de la administración (tal como dentro de 1 minuto o dentro de 1 a 5 minutos de la administración), y el rango de temperatura en el que la OPLS y el antígeno puede combinarse (tal como de 20 a 26 °C).
- En una realización, un kit comprende el componente de antígeno (por ejemplo, proteína, péptido o polipéptido) y el componente de composición lipídica. El kit también puede comprender un conjunto de instrucciones para la preparación y uso de los componentes. En una realización, la composición lipídica se selecciona del grupo que consiste en liposomas de OPLS y PS. En una realización, los liposomas de PS se seleccionan del grupo que consiste en PS/PC (con opcionalmente PE, donde la concentración de PC es 1-10 % en moles y PE % en moles desplaza la cantidad de PC) y PS/PI, como se describe en el presente documento. En una realización, el kit comprende un antígeno (tal como el Factor VIII) en forma liofilizada, un vial de medio de reconstitución para preparar el antígeno y/o la composición lipídica (tal como OPLS) para la administración (tal como la administración subcutánea), un artículo de suministro de composición lipídica, y un conjunto de instrucciones para el almacenamiento, preparación y/o uso de los diversos componentes. En algunas realizaciones, el medio de reconstitución está compuesto por lípidos seleccionados del grupo que consiste en fosfatidilserina, fosfatidilcolina y combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, el medio de reconstitución es una solución OPLS. El medio de reconstitución es una solución tampón, sin embargo, el medio de reconstitución como se define en esta divulgación puede o no contener lípidos. Si el medio de reconstitución no contiene lípidos, entonces el otro vial en el kit proporcionará los lípidos necesarios. Si este es el caso, puede ser cualquier solución que contenga fosfatidilserina, incluida OPLS. El artículo de suministro de la composición lipídica puede ser un recipiente con una formulación líquida o liofilizada compuesta por la composición lipídica (tal como los liposomas OPLS y PS), una jeringa preempaquetada con la composición lipídica, un aerosol o lata espumosa que contiene la formulación compuesta por la composición lipídica para aplicación tópica, o un parche tópico que comprende la formulación compuesta por la composición lipídica. En las realizaciones donde se va a practicar la aplicación tópica, OPLS es la composición lipídica preferida debido a su capacidad de penetrar en la piel. El conjunto de instrucciones puede ser material impreso o medio de almacenamiento electrónico de información, tal como memorias USB, tarjetas electrónicas y similares. El conjunto de instrucciones puede proporcionar instrucciones sobre el sitio, la secuencia y la frecuencia de administración de los componentes y cualquier otra información relevante para el uso previsto. Los diversos componentes del kit pueden proporcionarse en viales o recipientes separados dentro del kit, o como una unidad (tal como en compartimentos separados en un embalaje de un blíster).
- En una realización, esta divulgación proporciona un procedimiento para inducir tolerancia inmune hacia un antígeno que comprende: a) proporcionar una primera composición que comprende OPLS, que está sustancialmente libre del antígeno, y una segunda composición que comprende el antígeno, que está sustancialmente libre de OPLS, y b) administrar la primera y la segunda composiciones por separado a través de una ruta cutánea a un individuo; en la que las dos composiciones se administran en sitios que están dentro de 5,08 centímetros entre sí. El antígeno y OPLS pueden administrarse en solución isotónica (270 a 300 mmoles/kg) o en soluciones hipertónicas (mayores de 300 mmol/kg). En diversas realizaciones, el agente puede ser un agente terapéutico, que puede estar presente en dosis terapéuticas o subterapéuticas. Una o ambas composiciones pueden administrarse una vez o más semanalmente durante 1 a 12 semanas o más. El término "sustancialmente libre" como se usa en esta divulgación significa que la cantidad de los materiales particulares presentes en la composición no es suficiente para tener un efecto biológico clínicamente relevante detectable. Por ejemplo, una composición de OPLS está sustancialmente libre de un antígeno si está presente menos del 0,5 % en moles del antígeno. De manera similar, una composición del antígeno está sustancialmente libre de OPLS (u otros componentes lipídicos) si está presente menos del 0,5 %

en moles de OPLS (o un componente lipídico). En algunas realizaciones, menos del 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05 % en moles de OPLS o antígeno están presentes en las composiciones del antígeno u OPLS respectivamente.

En una realización, esta divulgación proporciona un procedimiento para inducir tolerancia inmune hacia un antígeno que comprende administrar a un individuo una composición que comprende OPLS y una cantidad subterapéutica de antígeno. La OPLS y la dosis subterapéutica de antígeno pueden estar en composiciones separadas o en la misma composición. Cuando están presentes en la misma composición, la OPLS y el antígeno son tales que están unidos o no unidos libremente. Las composiciones pueden administrarse a través de las mismas o diferentes rutas cutáneas. Una dosis subterapéutica de un antígeno terapéutico se define como una dosis que es al menos 50 % menor que (es decir, puede ser 1/2 de) la dosis terapéutica aceptable más baja. Las dosis terapéuticas de diversas terapias son bien conocidas por los médicos y los expertos en la técnica. En diversas realizaciones, la dosis subterapéutica puede ser cualquier fracción de 1/2 a 1/100 de la dosis terapéutica. En una realización, puede ser de 1/100 a 1/500 de una dosis terapéutica. Como ejemplo, se considera que una dosis terapéutica para FVIII es de 40 UI/kg a 400 UI/kg, y una dosis subterapéutica es de 20 UI/kg y menor. En una realización, una dosis subterapéutica es de aproximadamente 10 UI/kg. Como otro ejemplo, la dosis clínica o terapéutica de GAA es de 20 mg/kg, mientras que una dosis subterapéutica es de 10 mg/kg. En una realización, la dosis subterapéutica es de 1 µg a 1 mg/kg.

En una realización, esta divulgación proporciona un procedimiento para inducir tolerancia inmune hacia un antígeno que comprende administrar a un individuo una composición que comprende OPLS y una cantidad terapéutica de antígeno. La OPLS y la dosis terapéutica de antígeno pueden estar en composiciones separadas o en la misma composición. Cuando están presentes en la misma composición, la OPLS y el antígeno son tales que están unidos libremente (K_d de 10 µM a 500 µM o no unidos (K_d de más de 500 µM)). Las composiciones pueden administrarse por la misma o diferentes rutas cutáneas. En una realización, el agente es un anticuerpo, que puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un fragmento de un anticuerpo o combinaciones de los mismos.

En una realización, la presente divulgación proporciona un procedimiento para inducir tolerancia inmune hacia un antígeno en un individuo que comprende a) obtener células dendríticas del individuo; b) poner en contacto las células dendríticas con OPLS y el antígeno *in vitro*; y c) devolver las células dendríticas al individuo. Las células dendríticas pueden estar expuestas a OPLS y al antígeno al mismo tiempo o secuencialmente. El antígeno puede usarse a una dosis terapéutica o una dosis subterapéutica. En una realización, las células dendríticas pueden estar expuestas a más de un antígeno.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona kits para inducir tolerancia inmune. Los kits pueden comprender uno o más de los siguientes: una composición que comprende OPLS (que está sustancialmente libre o completamente libre del antígeno); una composición que comprende uno o más antígenos (que está sustancialmente libre o completamente libre de OPLS u otros componentes lipídicos); instrucciones para la administración por vía cutánea, o instrucciones para exponer células *in vitro*; opcionalmente, uno o más dispositivos de administración para la administración de las composiciones. Los dispositivos de administración pueden ser jeringas, lápiz para inyección, parches dérmicos y similares.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención. No están destinados a ser limitantes de ninguna manera. El ejemplo 14 está de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos 1 a 13, 15 y 16 son ejemplos de referencia.

Ejemplo 1

Este ejemplo proporciona caracterización de composiciones de antígeno OPLS administradas.

Materiales: El FVIII humano recombinante de longitud completa (Baxter Biosciences, Carlsbad, CA) se obtuvo como obsequio de la Western New York Hemophilia Foundation. Ova e IgG humana eran de Sigam (St. Louis, MO). Humira y Rituximab están disponibles comercialmente. Para la presente divulgación, Humira se obtuvo comercialmente de una farmacia. O-Fosfo-L-Serina (OPLS) se adquirió de Sigma (Sr. Louis, MO). Todos los disolventes y sales tampón se obtuvieron de Fisher Scientific (Fairlawn, NJ) o de Sigma (St. Louis, MO). Los anticuerpos monoclonales anti-FVIII ESH8 se obtuvieron de American Diagnostica Inc. (Greenwich, CT). La IgG de cabra anti-ratón se adquirió de Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, AL). La albúmina de suero bovino (BSA) se adquirió de Sigma (St. Louis, MO) mientras que el sistema de sustrato de fosfatasa (tampón de dietanolamina y fosfato de p-nitrofenilo) se adquirió de KPL Inc. (Gaithersburg, MD). El kit de ensayo Chromogenix Coamatic FVIII se adquirió de DiaPharma Group (West Chester, OH) para la detección de FVIII en plasma. El kit de análisis de titulación IgG anti-Ova fue de alphadiagnostic international.

Efecto de OPLS sobre la inmunogenicidad de FVIII después de la administración SC *in vivo*: 21 ratones HA entre 6 y 8 semanas de edad se dividieron en 3 grupos: el grupo uno recibió 1 µg de FVIII SC en la región abdominal. El grupo dos recibió 1µg FVIII más 0,4 mg OPLS SC en la región abdominal y el grupo 3 recibió 1µg FVIII más 5mg OPLS sc en la región abdominal. La incubación de FVIII con OPLS a 37 °C durante 30 minutos aseguró la formación de complejos, pero para este ejemplo, OPLS y FVIII se combinaron a las concentraciones deseadas a temperatura ambiente (22 °C) y se administraron inmediatamente (dentro de 1 minuto). Este tratamiento se administró un día 1,

8, 10 y 12. Tres días después de la última inyección, los animales fueron sacrificados. La sangre se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos a 4 grados centígrados. Luego se eliminó el plasma y se almacenó a -80 grados Celsius hasta el análisis. Los resultados se muestran en la Figura 3.

5 Los títulos totales se determinaron mediante ELISA estándar clásico. El anticuerpo anti-FVIII (ESH8) se usó como control. Las estadísticas se realizaron sobre la media aritmética de los datos transformados de registro, los gráficos se informan como medias geométricas. A los no respondedores se les dio el valor del factor específico de placa para la uniformidad.

10 PK de FVIII en ratones HA en presencia y ausencia de O-Fosfo-L-Serina: 60 ratones HA entre 6 y 8 semanas de edad se dividieron en 2 grupos de 30 animales cada uno. El primer grupo recibió 5 UI/g de FVIII en la región abdominal con masaje durante 60 segundos después de cada inyección. El segundo grupo recibió FVIII más OPLS (5IU/gFVIII más 0,4mg OPLS) en la región abdominal seguido de masaje como se indicó anteriormente. Se sacrificaron 3 animales de cada grupo en el siguiente punto de tiempo preestablecido 4,6,9,12,15,18,24,33 y 44 horas. Se recolectó sangre total, así como los nodos linfáticos inguinales. La sangre se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos a 4 grados centígrados. Todas las muestras se almacenaron a -80 grados Celsius hasta el análisis. Las muestras se analizaron usando el ensayo del kit Coamatic Factor VIII (DiaPharma West Chester, OH, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20 La coadministración intravenosa de OPLS y bioterapéutico (por ejemplo, FVIII) tiene poco efecto sobre la farmacocinética: solo se observó un ligero aumento en la exposición plasmática (Figura 4). Sin embargo, la coadministración subcutánea de bioterapéuticos con OPLS o liposomas de PS mejora la captación linfática del espacio subcutáneo, que es una vía de captación clave para proteínas grandes, y mejora su biodisponibilidad en comparación con la administración subcutánea del bioterapéutico solo. Cuando se administra s.c., OPLS puede detener eficazmente la eliminación rápida de bioterapéuticos del cuerpo. La captación linfática mejorada y el tiempo de residencia prolongado en los linfáticos se traduce en una exposición prolongada al plasma (Figura 5).

25 Efecto de OPLS en el perfil de citoquinas de las células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) en presencia y ausencia de antígeno proteico (FVIII): se aisló la médula ósea de 2 ratones HA entre las 6 y las 8 semanas de edad. En resumen, la médula ósea se cultivó en medio RPMI suplementado con albúmina fetal bovina, 2-macraoptoetanol, Pen/Strip y GMCSF. Los medios se cambiaron en los días 3, 6 y 8 de cultivo y se usaron DC en el día 9 o 10. Este procedimiento de cultivo prolongado dio como resultado 70-80 % de DC inmaduras en el día 9 o 10. Una vez que se recolectan las DC, se exponen a uno de los siguientes grupos de tratamiento: ingenuo (control negativo), FVIII solo (control positivo), FVIII con dosis crecientes de OPLS 10 mM, 50 mM y 100 mM OPLS, OPLS solo (100 nM) y lipopolisacáridos (control positivo para la respuesta a la inflamación). Las células se colocaron en placas por triplicado y se hicieron 2 juegos. Uno se usó para el análisis de citoquinas y se permitió que permaneciera en cultivo durante 72 horas antes de que se recolectaran los medios para el análisis de citoquinas. Las concentraciones de TGF- β , TNF- α e IL-6 se determinaron utilizando ELISA estándar (kit DuoSet ELISA, R&D System Inc. Minneapolis, MN, EE. UU.). Se permitió que el otro conjunto permaneciera en cultivo durante 24 días antes de que se retiraran los medios y las CD se cocultivaron con células T CD4⁺ aisladas de bazo de ratones HA expuestos a un programa de inmunización agresivo con FVIII de la siguiente manera: semana 1: lunes 1 ug de FVIII dado SC. Semana 2: Lunes, miércoles y viernes 1 ug de FVIII dado SC en cada uno de esos días. 72 horas después de la última inmunización, los animales se sacrifican y se recogen los bazo, se trituran y se aíslan las células T CD4⁺ usando un kit de aislamiento negativo (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, EE. UU.) según el protocolo del fabricante. Después de 72 horas de cocultivo con DC, se retira el sobrenadante y se realiza un análisis de citoquinas usando ELISA estándar para determinar la producción de TFG- β e IL-17 por las células T. (Kit DuoSet ELISA, R&D System Inc. Minneapolis, MN, EE. UU.). Los resultados se muestran en la Figura 1.

45 La unión de OPLS a varias proteínas terapéuticas se evaluó mediante espectroscopía de fluorescencia (Figura 2). La emisión de fluorescencia se redujo a medida que aumentaba la concentración de OPLS. Los cambios de intensidad de fluorescencia fueron más altos para FVIII en comparación con GAA y OVA. La constante de unión estimada basada en la titulación espectroscópica mostró que FVIII se une a OPLS con la mayor afinidad, mientras que GAA y OVA con menor afinidad. La unión de alta afinidad por FVIII es consistente con la existencia de un dominio putativo de unión a lípidos.

50 Ejemplo 2

Este ejemplo describe el efecto de OPLS sobre la inmunogenicidad de la ovoalbúmina (Ova) después de la administración de SC *in vivo*:

55 Procedimientos: 14 ratones SW entre 6 y 8 semanas de edad se dividieron en 2 grupos: el grupo uno recibió 1 ug OVA SC en la región abdominal. El grupo dos recibió 1ug OVA/5 mg OPLS SC en la región abdominal. Este tratamiento se administró un día 1, 8, 10 y 12. Tres días después de la última inyección, los animales fueron sacrificados. La sangre se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos a 4 grados centígrados. Luego se retiró el plasma y se almacenó a -80 grados Celsius hasta que se obtuvieron los valores de los títulos utilizando un kit de análisis de titulación IgG anti-Ova según las instrucciones del fabricante (alphadiagnostic international). Las estadísticas se realizaron sobre la media aritmética de los datos transformados de registro, los gráficos se informan

como medias geométricas. A los no respondedores se les dio el valor del factor específico de placa para uniformidad.

5 Como se muestra en la Figura 6 (a), los títulos de anticuerpos anti-Ova fueron más bajos en ratones a los que se les coadministraron OPLS (Sigma) (dosis de 5 mg) y Ova (Sigma) (1 ug) a través de ruta s.c. que en aquellos administrados Ova (1 ug) solo (también a través de la ruta s.c.). En este caso, la falta de unión entre OPLS y Ova sugiere que la reducción en la inmunogenicidad observada cuando OPLS se administra conjuntamente con Ova se debe al mecanismo inmunológico descrito anteriormente (distinto de la inducción de tolerancia).

Ejemplo 3

Este ejemplo describe el efecto de OPLS en la inmunogenicidad de la proteína alfa glucosidasa ácida (GAA)

10 Materiales y procedimientos: GAA Fuente: rhGAA recombinante de longitud completa se produjo en células de embrión de riñón humano para nuestro uso por Creative Biomart (Shirley, NY); Fuente de OPLS: Sigma-Aldrich (St.Louis, MO). n= 8 animales/grupo fueron inmunizados con 4 inyecciones s.c. semanales de 1 ug de GAA en 100 ul de TRIS estéril para el grupo libre o en OPLS de 5 mg en TRIS estéril para el grupo OPLS-GAA. Un grupo de 8 ratones recibió la misma dosis de CBrhGAA en solución de 5 mg de O-fosfo-D-serina (OPDS) como control negativo.

15 Después de un período de descanso de 2 semanas, se recogió una muestra de sangre de la vena safena. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta el análisis. Estas muestras fueron luego analizadas para títulos de Ab anti-GAA. Los títulos de anticuerpos anti-GAA se midieron de la siguiente manera: la placa ELISA (maxisorp, NUNC) se recubrió con 50 ul de 5 µg/ml de rhGAA estéril en tampón de carbonato-bicarbonato de sodio pH = 9,6. La placa se incubó durante la noche a 4 °C. La placa se lavó seis veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % (PBS-T, 250 ul/pocillo) usando un lavador automático de placas. La placa se bloqueó con PBS que contenía BSA al 1 % (300 ul/pocillo) como tampón de bloqueo durante 2 horas a 37 °C. La placa se lavó seis veces con PBS-T. Luego se añadió una dilución en serie de muestras (100 ul/pocillo) a la placa por duplicado. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C. La placa se lavó seis veces con PBS-T. El anticuerpo de detección (dilución 1:10000 y 100 ul/pocillo) en tampón de bloque se añadió a los pocillos y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó seis veces con PBS-T. Se añadió sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (100 ul/pocillo) a los pocillos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2 N y se leyó inmediatamente a 450 nm usando un lector de microplacas. Los valores de los títulos se cuantifican utilizando un procedimiento de punto final estadístico según lo descrito por Frey et al. Las muestras en plasma de control se procesaron en cada placa. Análisis estadístico: ANOVA unidireccional de diferencia estadística (p <0,05) seguido de la prueba de comparación múltiple post-hoc de Dunnette usando GraphPad Prism (Frey et al., J. Immunol. Methods, 1998. 221 (1-2): p. 35 -41).

20

25

30

Como se muestra en la Figura 6 (c), los títulos de anticuerpos anti-GAA fueron más bajos en ratones que se coadministraron bien sea: (a) OPLS (dosis de 5 mg) y GAA a través de la ruta s.c., o (b) OPDS (dosis de 5 mg) y GAA a través de la ruta s.c., que en aquellos administrados GAA solo (también a través de la ruta s.c.). Los niveles de título anti-GAA fueron más bajos en ratones coadministrados con OPLS y GAA. La ligera reducción en los títulos de anticuerpos anti-GAA observados en ratones coadministrados con OPDS y GAA es probablemente atribuible a la conversión de OPLS a OPDS *in vivo*. En este caso, la falta de unión entre OPLS y GAA sugiere que la reducción en la inmunogenicidad observada cuando OPLS se administra conjuntamente con GAA se debe al mecanismo inmunológico descrito anteriormente (distinto de la inducción de tolerancia). Se observaron hallazgos similares después de la coadministración de PS-liposomas con GAA (Figura 10).

35

40

Ejemplo 4

Este ejemplo describe el efecto de OPLS sobre la inmunogenicidad de adalimumab.

Procedimientos: n= 8 animales/grupo fueron inmunizados con 4 inyecciones sc semanales de 10 ug de adalimumab en 100 ul de TRIS estéril para el grupo libre o en 5 mg de OPLS en TRIS estéril para el grupo OPLS-Adalimumab.

45 Después de un período de descanso de 2 semanas, se recolectó una muestra de sangre de la vena safena para el análisis del título. Los valores de los títulos se obtuvieron mediante un ELISA en sándwich clásico. En resumen, se recubrieron placas Nunc-Maxisorb de 96 pocillos durante la noche a 4 °C con 50 µl/pocillo de Humira 2,5 µg/ml. Las placas entonces se lavaron y bloquearon con albúmina de suero bovino al 1 % (tampón de bloqueo). Se añadieron 50 µl/pocillo de diversas diluciones de la muestra a la placa y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h. Las muestras en plasma de animales expuestas a un tratamiento simulado (solo tampón) sirvieron como controles. Las placas se lavaron luego y se incubaron con 50 µl de conjugado anti-cuerpo-HRP anti-ratón de cabra a una dilución 1:50000 en tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 h. El color se desarrolló durante 20 minutos con 100 µl de solución TMB. Se usaron 100 ul de H₂SO₄ 2 N para detener la reacción. La densidad óptica a 405 nm se midió usando un lector de placas. A los no respondedores se les dio el valor del factor específico de placa para la uniformidad.

50

55

Como se muestra en la Figura 6 (d), los títulos de anticuerpos anti-Humira fueron más bajos en ratones a los que se les administró OPLS (dosis de 5 mg) y Humira® (10 mg/g) a través de la ruta s.c. que en aquellos a los que se administró Humira® solo (10 mg/g) (también a través de la ruta s.c.) después de 4 inyecciones semanales seguidas

de un período de lavado de 2 semanas. Los valores de los títulos se obtuvieron mediante el ELISA en sándwich clásico en el que las placas se recubrieron con Humira antes de la incubación con diluciones con muestras en plasma, se detectaron anticuerpos anti-Humira con anticuerpos conjugados anti-ratón-HRP de rata. En este caso, la unión débil entre OPLS y Humira® sugiere que la reducción en la inmunogenicidad observada cuando OPLS se administra conjuntamente con Humira® se debe al mecanismo inmunológico descrito anteriormente (distinto de la inducción de tolerancia). Es muy dudoso que la unión débil que se ve aquí esté "protegiendo" un epítipo inmunológico.

Ejemplo 5

Este ejemplo describe el efecto de OPLS en la inmunogenicidad de IgG humana.

10 Materiales y procedimientos: se usaron 8 animales para este estudio piloto, 4 animales fueron inyectados con IgG humana (Sigma) sola (1ug) o con IgG humana más OPLS (IgG humana 1ug más OPLS 0,4 mg). El estudio se realizó con 4 inyecciones durante un período de 2 semanas de la siguiente manera: día 1, día 8, día 10 y día 12, seguido de un período de lavado de 3 días. Se realizó ELISA para medir los títulos totales. En resumen, se recubrieron placas Nunc-Maxisorb de 96 pocillos durante la noche a 4 °C con 50 µl/pocillo de IgG humana de 2,5 µg/ml. Las placas se lavaron y bloquearon con albúmina de suero bovino al 1 % (tampón de bloqueo). Se añadieron 50 µl/pocillo de diversas diluciones de la muestra a la placa y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h. Las muestras en plasma de animales expuestas a un tratamiento simulado (solo tampón) sirvieron como controles. Luego se lavaron las placas y se incubaron con 50 µl de conjugado de anti-cuerpo-HRP anti-ratón de cabra a una dilución 1:50000 en tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 h. El color se desarrolló durante 20 minutos con 100 µl de solución TMB. Se usaron 100 ul de H₂SO₄ 2 N para detener la reacción. La densidad óptica a 405 nm se midió usando un lector de placas. A los no respondedores se les dio el valor del factor específico de placa para la uniformidad.

En este estudio piloto, a los animales se les inyectó IgG humana (Sigma) solo (1ug) o OPLS (5 mg). El estudio se realizó con 4 inyecciones durante un período de 2 semanas de la siguiente manera: día 1, día 8, día 10 y día 12, seguido de un período de lavado de 3 días. Los títulos se obtuvieron mediante ELISA clásico como se mencionó anteriormente. Como se muestra en la Figura 7, los títulos de anticuerpos anti-IgG fueron menores en ratones que recibieron OPLS coadministrados (dosis de 0,4 mg) e IgG a través de la ruta s.c. que en aquellos administrados IgG solo (también a través de la ruta s.c.). Se espera que, como se ve con otros productos bioterapéuticos probados, dosis más altas (5 mg o más) de OPLS tendrán un efecto aún más pronunciado en los niveles de título cuando se coadministran con IgG.

Ejemplo 6

Este ejemplo describe el efecto de OPLS en la inmunogenicidad de Rituximab (RXT).

35 Materiales y procedimientos: 30 ratones SW entre 6 y 8 semanas de edad se dividieron en 3 grupos: el grupo uno recibió 1 ug RXT SC en la región abdominal. El grupo dos recibió 1ug RXT/0,4 mg OPLS SC en la región abdominal y el grupo 3 recibió 1ug RXT/5mg OPLS sc en la región abdominal. Este tratamiento se administró un día 1, 8, 10 y 12. Tres días después de la última inyección, los animales fueron sacrificados. La sangre se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos a 4 grados centígrados. Luego se retiró el plasma y se almacenó a -80 grados Celsius hasta el análisis. Los títulos totales se determinaron mediante ELISA estándar clásico. En resumen, se recubrieron placas Nunc-Maxisorb de 96 pocillos durante la noche a 4 °C con 50 µl/pocillo de 2,5 µg/ml de RXT. Las placas se lavaron y bloquearon con albúmina de suero bovino al 1 % (tampón de bloqueo). Se añadieron 50 µl/pocillo de diversas diluciones de la muestra a la placa y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h. Las muestras en plasma de animales expuestas a un tratamiento simulado (solo tampón) sirvieron como controles. Luego se lavaron las placas y se incubaron con 50 µl de conjugado de anti-cuerpo- HRP específico de FC anti-ratón de cabra a una dilución 1:50000 en tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 h. El color se desarrolló durante 20 minutos con 100 µl de solución TMB. Se usaron 100 ul de H₂SO₄ 2 N para detener la reacción. La densidad óptica a 405 nm se midió usando un lector de placas. A los no respondedores se les dio el valor del factor específico de placa para la uniformidad. Las estadísticas se realizaron sobre la media aritmética de los datos transformados de registro, los gráficos se informan como medias geométricas. A los no respondedores se les dio el valor del factor específico de placa para la uniformidad.

50 Como se muestra en la Figura 8, los títulos de anticuerpos anti-RXT fueron más bajos en ratones a los que se les administró OPLS coadministrados de forma dependiente de la dosis 5 mg versus 0,4 mg y RXT (1ug) a través de la ruta s.c. que en aquellos administrados RXT (1 ug) solo (también a través de la ruta s.c.).

Ejemplo 7

55 Este ejemplo describe el efecto de OPLS y los liposomas de PS en la inmunogenicidad del péptido alfa glucosidasa ácida (GAA)

Materiales y procedimientos. Fuente del péptido GAA: Este péptido GAA fue producido por American Peptide Company (Sunnyvale, CA). Produjeron para los inventores un péptido de 13 aminoácidos de largo que contiene los

aminoácidos 339-352 de la secuencia GAA de longitud completa, YIFLGPEPKSVVQ. Fuente de OPLS: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) Dosis de concentración de péptido: 10 ug/inyección. Péptido GAA libre (n= 4), péptido PS-GAA (n= 4) y péptido OPLS-GAA (n= 5). Cada ratón recibió 4 inyecciones subcutáneas (s.c.) semanales cerca de la base de la cola de 100 µl/inyección de su tratamiento. Dos semanas después de la última inyección, se tomó una muestra de sangre retroorbital de cada ratón. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta el análisis. Estas muestras fueron luego analizadas para títulos de péptido Ab anti-GAA. Los títulos de anticuerpos anti-GAA se midieron de la siguiente manera: La placa ELISA (maxisorp, NUNC) se recubrió con 100 µl de 10 µg/ml de rhGAA estéril en tampón de carbonato-bicarbonato de sodio pH = 9,6. La placa se incubó durante la noche a 40 °C. La placa se lavó seis veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % (PBS-T, 250 ul/pocillo) usando un lavador automático de placas. La placa se bloqueó con PBS que contenía BSA al 1 % (300 ul/pocillo) como tampón de bloqueo durante 2 horas a 37 °C. La placa se lavó seis veces con PBS-T. Luego se añadió una dilución en serie de muestras (100 ul/pocillo) a la placa por duplicado. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C. La placa se lavó seis veces con PBS-T. El anticuerpo de detección (dilución 1:10000 y 100 ul/pocillo) en tampón de bloque se añadió a los pocillos y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó seis veces con PBS-T. Se añadió sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (100 ul/pocillo) a los pocillos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2 N y se leyó inmediatamente a 450 nm usando un lector de microplacas. Los valores de los títulos se cuantificaron utilizando un procedimiento de punto final estadístico según lo descrito por Frey et al. Las muestras en plasma de control se procesaron en cada placa. Análisis estadístico: ANOVA unidireccional de diferencia estadística (p <0,05) seguido de la prueba de comparación múltiple post-hoc de Dunnetta usando GraphPad Prism.

Como se muestra en la Figura 9, los títulos de anticuerpos anti-péptido GAA fueron más bajos en ratones que fueron coadministraron bien sea: (a) OPLS (dosis de 5 mg) y péptido GAA a través de la ruta s.c., o (b) liposomas de PS (PS/PC, relación proteína:lípido 1:10.000 basada en M.W. de proteína) y péptido GAA a través de la ruta s.c., que en los péptidos GAA administrados solos (también a través de la ruta s.c.). Los niveles de título de péptido anti-GAA fueron más bajos en ratones coadministrados con OPLS y GAA.

El péptido GAA no se unió a OPLS. Dado que el péptido GAA no tiene fluorescencia interna, se necesitaba usar un procedimiento diferente en comparación con los otros estudios de unión de proteína-OPLS. En lugar de usar fluorescencia para detectar la unión, se usó espectroscopía ultravioleta/visible.

Ejemplo 8

Este ejemplo describe la inducción de tolerancia hacia la proteína GAA usando OPLS y liposomas de PS.

Materiales: Se produjo rhGAA recombinante de longitud completa en células de embrión de riñón humano para el uso de los inventores por Creative Biomart (Shirley, NY). Se adquirieron dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidilserina cerebral (PS) de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). O-fosfo-L-serina (OPLS), IgG de cabra-anti-ratón, peroxidasa de rábano picante, sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Animales: Se adquirieron parejas reproductoras de ratones con la enfermedad de Pompe en un Laboratorio Jackson (Bar Harbor, Maine). Se estableció una colonia homocigota para el gen anulado y se usaron animales de edades comprendidas entre 8 y 12 semanas para los estudios *in vivo*.

Tolerancia GAA con OPLS. Procedimientos: n= 8 animales/grupo fueron inmunizados con 4 inyecciones sc semanales de 1 ug de GAA en 100 ul bien sea de TRIS estéril para el grupo libre o en OPLS de 5 mg en TRIS estéril para el grupo OPLS-GAA. Un grupo de 8 ratones recibió la misma dosis de GAA en una solución de 5 mg de O-fosfo-D-serina (OPDS) como control negativo. Después de un período de descanso de 2 semanas, se recolectó una muestra de sangre de la vena safena. Los ratones fueron entonces reexpuestos con 1 ug de GAA libre en TRIS estéril durante 4 semanas. Los ratones se sacrificaron después de otro período de descanso de 2 semanas y se recolectó plasma que se almacenó a -80 °C hasta el análisis por ELISA para títulos de anticuerpos anti-GAA.

Tolerancia GAA con liposomas de PS. Procedimientos: n= 8 animales/grupo fueron inmunizados con 4 inyecciones sc semanales de 1 ug de GAA en 100 ul bien sea de TRIS estéril para el grupo libre o formulación liposomal PS para el grupo PS (30 % PC, 70 % DMPC). Un grupo de 8 ratones recibió la misma dosis de GAA en la formulación liposomal PG30 (30 % de PG, 70 % de DMPC) como un control negativo con carga equivalente. Después de un período de descanso de 2 semanas, se recolectó una muestra de sangre de la vena safena. Los ratones fueron entonces reexpuestos con 1 ug de GAA libre en TRIS estéril durante 4 semanas. Los ratones se sacrificaron después de otro período de descanso de 2 semanas y se recolectó plasma que se almacenó a -80 °C hasta el análisis por ELISA para títulos de anti-GAA Ab.

Títulos de anticuerpos anti-GAA. La placa ELISA (maxisorp, NUNC) se recubrió con 50 ul de 5 µg/ml de GAA estéril en tampón de carbonato-bicarbonato de sodio pH = 9,6. La placa se incubó durante la noche a 4 °C. La placa se lavó seis veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % (PBS-T, 250 ul/pocillo) usando un lavador automático de placas. La placa se bloqueó con PBS que contenía BSA al 1 % (300 ul/pocillo) como tampón de bloqueo durante 2 horas a 37 °C. La placa se lavó seis veces con PBS-T. Luego se añadió una dilución en serie de muestras (100 ul/pocillo) a la placa por duplicado. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C. La placa se lavó seis veces con PBS-T. El anticuerpo de detección (dilución 1:10000 y 100 ul/pocillo) en tampón de bloque se añadió a los

pocillos y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó seis veces con PBS-T. Se añadió sustrato TMB (100 ul/pocillo) a los pocillos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2 N y se leyó inmediatamente a 450 nm usando un lector de microplacas. Los valores de los títulos se cuantifican utilizando un procedimiento de punto final estadístico según lo descrito por Frey et al. (Journal of Immunological Methods, 1998. 221 (1-2): p. 35-41). Las muestras en plasma de control se procesaron en cada placa. Análisis estadístico: ANOVA unidireccional de diferencia estadística ($p < 0,05$) seguido de la prueba de comparación múltiple post-hoc de Dunnett usando GraphPad Prism.

Resultados: Se encontró que los títulos de anticuerpos anti-GAA después de una reexposición a GAA eran significativamente más bajos para los animales tratados con OPLS-GAA en comparación con aquellos tratados con GAA libre como se ve en la Figura 13. Los títulos de anticuerpos anti-GAA después de una reexposición a GAA se encontró que es significativamente menor para los animales tratados con liposomas GAA-PS en comparación con los tratados con GAA libre como se ve en la Figura 14.

Ejemplo 9

Este ejemplo describe Tregs en la hiporrespuesta mediada por PS

Metodología: Se realizaron estudios de inmunización en el modelo de ratones con hemofilia A. Los animales ($n=3$ /grupo de tratamiento) recibieron inyecciones S.C. bien sea de FVIII libre o FVIII-PS (2 μ g de FVIII) cada semana durante 12 semanas. Dos semanas después de la última inyección, las células T CD4⁺ se aislaron del bazo del animal inmunizado y se tiñeron con FITC conjugado con anticuerpo CD4 y PE conjugado con anticuerpo anti FoxP3. Las células positivas dobles se analizaron usando citometría de flujo. Con el fin de determinar la superposición espectral de FITC y PE, se adquirió la compensación usando controles FITC y PE etiquetados individualmente y la compensación se realizó usando el software FlowJO. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la prueba t de 1 cola pareada usando el software Minitab.

Resultados: La expresión de FoxP3 se analizó como un biomarcador para Treg. Las células CD4+FoxP3+ doble positivas fueron significativamente mayores para el grupo de tratamiento con FVIII-PS en comparación con el grupo de tratamiento con FVIII solo (Figura 16).

Ejemplo 10

Este ejemplo describe el papel de las células B de memoria en la hiporrespuesta mediada por PS.

Metodología: Se realizaron estudios de inmunización en el modelo de ratones con hemofilia A con reintroducción de GFP-FoxP3. Los animales ($n = 7$ u 8 /grupo de tratamiento) recibieron inyecciones S.C. bien sea de FVIII libre o FVIII-PS o FVIII-PG30 (2 μ g de FVIII) cada semana durante 12 semanas. Un grupo de animales ($n = 5$) se dejó sin tratamiento y sirvió como control ingenuo. Dos semanas después de la última inyección, todos los animales fueron sacrificados y las células B de memoria aisladas de sus bazos. Aproximadamente $0,1 \times 10^6$ células B de memoria de todos los ratones se transfirieron de manera adoptiva a través de la vena del pene a un ratón hemofílico GFP-FoxP3 ingenuo individual correspondiente. Después de un período de espera de 48 h, todos los animales receptores fueron inmunizados agresivamente con cuatro inyecciones s.c. semanales de 1 μ g de FVIII libre/inyección. Dos semanas después de la última inyección, se sacrificaron todos los animales y se recolectaron sus muestras en plasma para el análisis de los niveles de título de anticuerpos.

Resultados: las muestras en plasma se analizaron para determinar la presencia de niveles de título de anticuerpos anti-FVIII totales. Los ratones que recibieron células B de memoria de un ratón tratado con FVIII o de un ratón ingenuo (no tratado) generaron una respuesta inmune robusta al FVIII. En comparación, los ratones que recibieron células B de memoria de ratones donantes tratados con PS-FVIII exhibieron títulos de anticuerpos anti-FVIII significativamente reducidos. Sin embargo, las células B de memoria transferidas desde ratones tratados con FVIII asociado con otro lípido PG de carga negativa (FVIII-PG) no lograron reducir significativamente los títulos de anticuerpos (Figura 17).

Ejemplo 11

Este ejemplo describe el requisito de proximidad para inducir tolerancia inmune.

Se inyectó a los ratones liposomas de PS descargados en un flanco y FVIII libre en el otro flanco durante cuatro semanas, y luego se reexpusieron con FVIII libre durante cuatro semanas más antes del sacrificio. Si la proximidad espacial no es crítica, entonces el tratamiento con PS y FVIII separados espacialmente debería producir una reducción en los títulos. Sin embargo, los datos mostraron que tanto los títulos neutralizantes (425 ± 100 SEM, $n=5$) como los anti-FVIII totales (8197 ± 1235 SEM, $n=5$) no fueron significativamente diferentes que los títulos de FVIII libres, que tenían títulos neutralizantes de $469 \pm 63,3$ SEM ($n=5$), y títulos totales anti-FVIII de 5153 ± 893 SEM ($n=5$) (Figs. 18 y 19, respectivamente). No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento. Esto sugiere que se requiere proximidad espacial para la inducción de una hiporrespuesta duradera al FVIII por la formulación de PS.

El desarrollo de una respuesta inmune contra la administración exógena de FVIII es de gran preocupación clínica. Los anticuerpos neutralizantes se desarrollan en 15-30 % de los pacientes que reciben terapia de reemplazo, lo que reduce la eficacia de este tratamiento para pacientes con hemofilia A. Las estrategias actuales para revertir esta inmunogenicidad requieren la administración de grandes dosis de FVIII con inmunosupresores durante un período prolongado de tiempo, con frecuencia hasta un año. Esta estrategia es costosa y conlleva un riesgo considerable para el paciente que tendrá su sistema inmunológico comprometido durante la terapia. Por lo tanto, desarrollar nuevas formas de reducir la inmunogenicidad al FVIII es extremadamente importante.

Estudios anteriores han demostrado que la formación de complejos de FVIII con PS reduce la respuesta inmune contra FVIII en ratones hemofílicos. La inducción de hiporrespuesta al FVIII por la formulación de PS-FVIII puede considerarse como una estrategia de "vacunación inversa". En lugar de intentar establecer una respuesta inmune contra un antígeno, el objetivo de la terapia es desensibilizar al paciente contra un antígeno. Si el mecanismo en el que se logra esto se asemeja a la forma en que las células apoptóticas inducen tolerancia a sus proteínas intracelulares, entonces esta hiporrespuesta debería ser específica del antígeno. Una respuesta inespecífica también sería clínicamente indeseable, ya que conduciría a la inmunosupresión.

Con el fin de que se desarrolle esta hiporrespuesta, se debe requerir proximidad espacial entre FVIII y PS, ya que la apoptosis es un evento local que ocurre a nivel celular. Para probar esto, los ratones recibieron liposomas de PS descargados en un flanco y FVIII libre en el flanco opuesto, y se fueron reexpuestos a FVIII libre. Estos ratones no mostraron diferencias en la respuesta inmune al FVIII cuando se compararon con el control de FVIII libre. Estos datos sugieren que se requiere una proximidad anatómica cercana para que se desarrolle la hiporrespuesta. Esta observación respalda la teoría de que PS-FVIII utiliza la mímica apoptótica para inducir tolerancia al FVIII.

En conclusión, de estos datos resulta claro que los efectos inmunológicos de las formulaciones de liposomas de PS-FVIII son específicos tanto para FVIII como antígeno así como para la proximidad anatómica de FVIII a los liposomas que contienen PS. Estas conclusiones son consistentes con la hipótesis de que la inducción de tolerancia mediante mimetismo apoptótico es el mecanismo para la reducción observada en la respuesta inmune como resultado de la terapia de PS-FVIII de vacunación inversa. Los estudios futuros deben abordar la posibilidad de que las formulaciones de liposomas que contienen PS reviertan los títulos establecidos, así como que induzcan hiporrespuesta a un antígeno que no sea FVIII.

Ejemplo 12

Este ejemplo describe la inducción apoptótica en células dendríticas.

La fosfatidilserina es un lípido de origen natural y forma parte de las vesículas liberadas por los tipos de células apoptóticas y de otro tipo e incluye exosomas, ectosomas, microvesículas, partículas de membrana y cuerpos apoptóticos. En una realización, las proteínas podrían ser cargadas en estas partículas después del aislamiento y podrían ser usadas para reducir la inmunogenicidad y/o la inducción de tolerancia. Las células dendríticas se aislaron de los progenitores de médula ósea de ratones con deficiencia de factor VIII. En resumen, se recolectaron células de médula ósea de fémur y tibia. Las células se cultivaron durante 8 días con cambio de medio cada dos días. El día 8, las células del medio RPMI en suspensión se recolectaron, se centrifugaron y se sembraron en placas frescas. Las células dendríticas inmaduras se utilizaron luego para la inducción apoptótica.

La inducción apoptótica en células dendríticas se probó de varias maneras. Algunos de los procedimientos probados fueron la irradiación UV usando un transiluminador UV 8W durante 1 hora/5 minutos, agregando una concentración total de butirato de sodio 5 mM, choque térmico a 45 °C durante 1 hora y agotamiento del suero durante 24 horas. Las células se granularon después de 48 horas de inducción a 300 g durante 10 minutos para eliminar los restos celulares, seguido de 2000 – 10.000 g durante 20 minutos y se requirieron 100.000 g para los exosomas. La eficacia de la inducción apoptótica se probó posteriormente utilizando el kit de Anexina V/Yoduro de propidio de Sigma usando microscopio fluorescente. Estos cuerpos y vesículas apoptóticas pueden cargarse con proteínas (FVIII, GAA, Humira, etc.) para reducir la inmunogenicidad y la inducción de tolerancia.

Ejemplo 13

Este ejemplo describe la caracterización de la seguridad de OPLS

Dado que los procedimientos aquí divulgados parecen funcionar mejor con dosis de OPLS que son iguales o superiores a 5 mg, es importante comprender la seguridad y la toxicidad de las dosis altas de OPLS. Como se muestra en las Figuras 11-14, las dosis repetidas altas (hasta 950 mg) de OPLS son bien toleradas tanto en los modelos de roedores como de primates.

Ejemplo 14

Este ejemplo describe el estudio de administración secuencial OPLS-GAA. Para determinar si OPLS puede ejercer sus efectos inmunomoduladores sobre la respuesta inmune a GAA cuando los dos se administran en inyecciones separadas, en el mismo sitio de inyección se llevaron a cabo los siguientes experimentos. Los ratones (n= 6 animales/grupo) se inmunizaron con 4 inyecciones sc semanales como sigue. Un grupo de animales recibió una

inyección combinada única de 5 mg de OPLS y 1 ug de rhGAA (volumen de 100 ul). El GAA humano recombinante fue producido por Creative Biomart. El segundo grupo recibió una inyección de 5 mg de OPLS (volumen de 100 ul) y luego, después de una espera de 5 minutos, recibieron una segunda inyección de 1 ug de rhGAA en TRIS estéril (volumen de 100 ul) en el mismo sitio de inyección. El grupo de control final recibió una inyección de TRIS estéril (volumen de 100 ul) luego, después de una espera de 5 minutos, recibió una segunda inyección de rhGAA de 1 ug en TRIS estéril (volumen de 100 ul) en el mismo sitio de inyección. Después de un período de descanso de dos semanas, se recolectó una muestra de sangre safena. Todos los ratones fueron entonces reexpuestos con 4 inyecciones semanales de 1 ug de rhGAA en 100 ul de TRIS estéril (una sola inyección). El análisis se realizó por ELISA para títulos totales. Los resultados se muestran en las Figuras 26-28. La GAA libre promedio después de 6 semanas fue de 3135 ± 910 , cuando se coadministró, la GAA fue de 787 ± 155 , y cuando se administró por separado (secuencialmente), la GAA fue de 926 ± 202 (Figura 26). Después de la nueva prueba, se realizó un muestreo final en la semana 11. Los resultados se muestran en la Figura 27. La GAA libre promedio después de 11 semanas fue de 8775 ± 2363 , cuando se coadministró, la GAA fue de 895 ± 335 , y cuando se administró por separado (secuencialmente), la GAA fue de 1884 ± 761 . Esto indica que los títulos de los ratones que recibieron bien sea GAA coadministrada con 5 mg de OPLS o GAA administrada en el mismo sitio 5 minutos después de una inyección de 5 mg de OPLS son significativamente más bajos después de la reexposición en comparación con los títulos en animales que recibieron GAA libre. Cualquiera de los procedimientos de administración fue capaz de inducir una hiporrespuesta hacia GAA. Los resultados combinados de 6 y 11 semanas se muestran en la Figura 28.

Ejemplo 15

En este ejemplo, se probaron los efectos de los tampones hipertónicos. Se generaron sistemas de tampón hipertónico utilizando tres excipientes diferentes: NaCl, manitol y O-Fosfo-L-Serina (OPLS). Se escogió NaCl como una sal genérica para manipular la osmolaridad. El manitol es un excipiente común GRAS (generalmente considerado como seguro) utilizado en formulaciones de proteínas. OPLS es el grupo principal del lípido inmunomodulador Fosfatidilserina (PS). Todos los tres excipientes son altamente solubles en medios acuosos. Se probaron los efectos de estos tampones en la farmacocinética de rituximab después de la administración sc en ratones Swiss Webster.

Material y procedimientos: los ratones Swiss Webster (19-22 g) (SW) eran de Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las pautas establecidas por el Institutional Animal Use and Care Committee at the University at Buffalo, Universidad Estatal de Nueva York.

Se utilizó la preparación comercial de rituximab (RXT). El anticuerpo anti-rituximab de rata se adquirió de AbD Serotec (Raleigh, NC). El anticuerpo conjugado HRP específico de FC anti-ratón de cabra, el sistema de sustrato 3,3',5,5' tetrametilbencidina (TMB), la albúmina de suero bovino (BSA), la O-Fosfo-L-Serina (OPLS) y el manitol se adquirieron de Sigma (San Luis, MO). Todos los demás disolventes y sales tampón se obtuvieron de Fisher Scientific (Fairlawn, NJ) o de Sigma (St. Louis, MO).

Preparación y caracterización de tampones de inyección: se prepararon un tampón TRIS isotónico y seis tampones hipertónicos diferentes para investigar los efectos de la hipertonidad y la composición del tampón en la absorción linfática de rituximab y la exposición al plasma (Tabla 1.).

Tabla 1

Tampón	Composición					
	Tris mM	NaCl mM	OPLS mM	manitol mM	pH	Osmolaridad mmol/kg
A	25	150	-	-	7.5	300
B	25	300	-	-	7.5	600
C	25	300	20	-	7.5	600
D	25	300	-	20	7.5	600
E	25	150	270	-	7.5	600
F	25	150	-	270	7.5	600

El tampón TRIS isotónico se preparó usando TRIS 25 mM y NaCl 150 mM (tampón A). Se prepararon tampones TRIS hipertónicos (600 mmol/kg) con TRIS 25 mM que contenía NaCl 300 mM (tampón B). Los tampones "C" y "E" contenían NaCl así como 20 mM de OPLS o manitol. Para delinear además los efectos de la composición del tampón sobre la absorción linfática, se prepararon dos tampones a 600 mmol/kg con 270 mM de OPLS (Tampón D) o manitol (Tampón F). Dado que la osmolaridad de estos tampones es la misma que los tampones "C" y "E", cualquier cambio en la absorción linfática se atribuirá al aumento de las concentraciones de OPLS y manitol. El pH se ajustó a 7,5. La osmolaridad se midió utilizando un osmómetro de presión de vapor 5500 (Wescor Inc. Logen UT, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Estudios farmacocinéticos de rituximab: 126 ratones SW machos se dividieron en 7 grupos. Cada grupo consistía en 18 animales, tres para cada punto de tiempo del perfil PK. Cada animal recibió 1ug/g de RXT formulado en una de las formulaciones descritas anteriormente (tabla 1). Todas las inyecciones sc se realizaron en la región abdominal equidistante del ganglio linfático inguinal. Ya que se espera que la absorción se complete a los 5 días, se eligieron los siguientes puntos de tiempo preestablecidos 1, 5, 15, 24, 48 y 120 horas para el sacrificio y la recolección de muestras. Se recolectó sangre total y ambos nodos linfáticos inguinales. La disposición de RXT se determinará a partir del perfil de PK iv y se complicará con los datos de absorción generados a partir de los estudios sc. Para el estudio de PK iv, a los animales se les dio 1 ug/g de RXT en tampón base (tampón A) a través de la vena del pene. La sangre total se recolectó en los siguientes puntos de tiempo: 0,5, 2, 15, 24, 48 y 120 h. La sangre se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos a 4 grados centígrados. Todas las muestras se almacenaron a -80 grados Celsius hasta el análisis. Inmediatamente antes del análisis; los nodos linfáticos inguinales se homogeneizaron en 300 µl de PBS en hielo y luego se analizaron.

Análisis de RXT en muestras en plasma y nodos linfáticos: El análisis de muestras en plasma y nodos linfáticos de estudios de PK se realizó con un ELISA estándar. En resumen, se recubrieron placas Nunc-Maxisorb de 96 pocillos durante una noche a 4 °C con 100 µl/pocillo de anticuerpo anti- RXT de 1 µg/ml (AbD Serotec Raleigh, NC). Las placas se lavaron y bloquearon con albúmina de suero bovino al 1 % (tampón de bloqueo). Las muestras se diluyeron según fue necesario hasta una dilución final de 1:100 o 1:1000 en tampón de bloqueo y se añadieron a la placa. Una dilución en serie de RXT en tampón de bloqueo también se agregó a la placa para la curva estándar. Se usaron 100 µl de anticuerpo conjugado de anti-humano-HRP de cabra a 5 µg/ml como un anticuerpo de detección. El color se desarrolló durante 20 minutos con 100 µl de solución TMB. Se usaron 50 µl de H₂SO₄ 2 N para detener la reacción. La densidad óptica a 450 nm se midió usando un lector de placas.

Resultados: farmacocinética de rituximab en ratones SW después de la administración iv y sc: El perfil de concentración plasmática-tiempo de rituximab después de la administración iv y sc de una dosis de 1 g/g en tampón isotónico A se muestra en la figura 29. Con base en los datos, la biodisponibilidad sc de rituximab en el Tampón A es de 0,29 (29 %). La fracción de la dosis absorbida por los nodos linfáticos se estima en 0,05 (5 % de la dosis absorbida total).

Efecto de la composición del tampón hipertónico en la captación linfática de rituximab: para dilucidar los efectos del tampón hipertónico en la captación linfática, se comparó la concentración de rituximab en los nodos linfáticos inguinales extirpados después de la administración sc de 1ug/g de rituximab en tampón isotónico (Tampón A) y tampón hipertónico (Tampón B) en ratones SW. Como se muestra en la figura 30, se observó un aumento en la concentración de rituximab en los nodos linfáticos administrado en el tampón B hipertónico en comparación con el Tampón A. El rituximab se recuperó de los nodos linfáticos de los animales en los primeros 2 puntos de tiempo en el grupo de Tampón A, la cantidad de rituximab en los nodos linfáticos de los animales en los puntos de tiempo restantes estaba por debajo del límite de detección de este ELISA. Sin embargo, todos los animales en el grupo tampón B tuvieron rituximab en sus nodos linfáticos durante todo el curso del estudio.

Para delinear además el efecto de la composición del tampón hipertónico sobre la absorción linfática, se comparó la concentración de rituximab en los nodos linfáticos administrada en los 5 tampones restantes en la tabla 1 con los resultados obtenidos del tampón B. Como se muestra en la Figura 31A, no hay un aumento sustancial en la concentración de rituximab en los nodos linfáticos administrada en tampón hipertónico OPLS 20 mM (tampón C) en comparación con tampón B, sin embargo, OPLS 270 mM (tampón E) dio como resultado un aumento en la concentración en nodos linfáticos en comparación con tampones B y C. Ya que la osmolaridad en los tres tampones es la misma (600 mOsmol) el aumento resultante en la fracción de la dosis tomada por los nodos linfáticos, y el aumento resultante en la concentración en nodos linfáticos, podría atribuirse al aumento de la concentración de OPLS en el tampón E versus B y C.

De manera interesante, cuando se utilizó manitol (tampones D y F), se observó un aumento en la concentración de rituximab en los nodos linfáticos administrados en tampones que contenían manitol en comparación con el tampón B libre de manitol (figura 31B). A diferencia de OPLS, este aumento fue independiente de la dosis de manitol. El modelo estimó que la fracción de la dosis absorbida por los nodos linfáticos era comparable en ambos tampones D y F; esto también fue comparable a la estimación obtenida para la dosis alta de OPLS (tampón E). Estos datos respaldan adicionalmente la noción de que la composición del tampón juega un papel en la absorción de los nodos linfáticos ya que la osmolaridad se mantuvo constante en los tres tampones.

Efecto de la composición del tampón hipertónico sobre las concentraciones plasmáticas y la biodisponibilidad de rituximab: para investigar si la absorción linfática mejorada se traduciría en una biodisponibilidad mejorada de rituximab, se analizaron muestras en plasma para determinar las concentraciones de rituximab y luego se modelaron como anteriormente. Como se muestra en la figura 29, se observa un aumento en la concentración plasmática de rituximab administrado en el tampón B hipertónico en comparación con el tampón A isotónico. A continuación, se comparó el efecto de la composición del tampón sobre la biodisponibilidad y el expositor plasmático comparando el perfil de tiempo de concentración plasmática de rituximab administrado en los 5 tampones restantes al tampón B. La figura 5A muestra los resultados obtenidos de tampones que contienen OPLS (C y E). Los datos muestran un aumento de la concentración plasmática de rituximab para ambos tampones en comparación con el tampón B, especialmente en los últimos puntos de tiempo. De manera similar, los tampones que contienen manitol D y F dieron como resultado una mayor concentración plasmática de rituximab en comparación con el tampón B.

Los tampones hipertónicos generales dieron como resultado una mayor biodisponibilidad de rituximab en comparación con el tampón isotónico. Además, la composición del tampón afectó a la bioava

Nuestros datos muestran que la absorción linfática mejoró cuando se administró rituximab en hipertónico (600 mmol/Kg). Adicionalmente, la composición del tampón jugó un papel en la absorción linfática, el manitol y la OPLS tuvieron un mejor desempeño que los tampones de la misma osmolaridad que contenían NaCl solo. La absorción linfática mejorada se correlacionó estrechamente con una exposición plasmática mejorada y una biodisponibilidad mejorada de rituximab.

Si bien no se pretende estar limitado a ninguna teoría en particular, se considera que los tampones hipertónicos en el espacio sc alteran el entorno en el medio intersticial. Este entorno es la fuerza impulsora detrás de la formación de fluido intersticial. Bajo condiciones normales, la sangre se filtra a través del extremo arteriolar del lecho capilar, un proceso impulsado por el aumento de la presión hidrostática en ese extremo en comparación con el extremo venular de los capilares. Corriente abajo de los capilares, la presión oncótica aumenta dentro de los capilares sanguíneos, lo que favorece la reabsorción del filtrado en la sangre que transporta desechos y subproductos del tejido. La hiperosmolaridad en el intersticio, resultante de tampones hipertónicos altera las condiciones osmóticas en el medio intersticial aumentando el volumen intersticial y dando como resultado un aumento del drenaje linfático. Se puede esperar que los efectos de la expansión del volumen por los tampones hipertónicos en el espacio sc duren hasta que se restablezca la osmolaridad. Esto puede explicar la ventaja del manitol y la alta dosis de OPLS sobre el NaCl solo.

Ejemplo 16

Este ejemplo demuestra que la OPLS reduce la inmunogenicidad al inducir propiedades tolerogénicas en las células dendríticas.

Materiales y procedimientos: se usó FVIII humano recombinante de longitud completa (Baxter Biosciences, Carlsbad, CA). La O-Fosfo-L-Serina (OPLS) se adquirió de Sigma (St. Louis, MO). Todos los disolventes y sales tampón se obtuvieron de Fisher Scientific (Fairlawn, NJ) o de Sigma (St. Louis, MO). El anticuerpo monoclonal anti-FVIII ESH8 se obtuvo de American Diagnostica Inc. (Greenwich, CT). Albúmina de suero bovino (BSA) premium inactivada por calor de Lonza Walkersville Inc. (Walkersville, MD). El medio RPMI-1640 era de Gibco Life Technologies (Carlsbad, CA). El kit Endosafe Endochrome-K® se adquirió de Charles River Laboratories, (Charleston, SC). Las placas NUNC MaxiSorp de 96 pocillos eran de ThermoScientific (Waltham, MA). Los kits de Cytokine ELISA eran de R&D System Inc. (DuoSet) (Minneapolis, MN, EE. UU.) o de Invitrogen (Camarillo, CA). DiIC18 (5) era de Sigma (St. Louis, MO). Los anticuerpos BD FC-block, anti-CD40-PE y anti-MHCII-FITC y los isotipos respectivos se adquirieron de BD Biosciences (San Jose, CA) o eBiosciences (San Jose, CA)

Estudios de inducción de tolerancia en ratones HA: se utilizaron parejas reproductoras de ratones hemofílicos transgénicos (HA) con eliminación del exón 16. Todos los estudios en animales se realizaron de acuerdo con un protocolo aprobado por el Institutional Animal Use and Care Committee at the University at Buffalo, Universidad Estatal de Nueva York.

Programa de inmunización y reexposición: para delinear si la reducción mediada por OPLS del título de anticuerpos se debe a la tolerancia inmune o la supresión inmune, se realizaron experimentos de reexposición. Cuarenta ratones HA fueron pretratados con FVIII, FVIII más OPLS o FVIII más Dexametasona una vez por semana durante cuatro semanas consecutivas mediante inyecciones sc de formulación libre de endotoxina de 1 µg de FVIII solo o con 5 mg de OPLS o 200 ng de Dexametasona (Dex) como se muestra en la figura 1. Las inyecciones se prepararon en tampones TRIS que contenían TRIS 25 mM y NaCl 150 mM a pH 7,5. Para las formulaciones que contienen OPLS, se añadió OPLS al tampón y el pH se ajustó a 7,5. La cantidad apropiada de FVIII se añadió inmediatamente antes de la inyección para evitar la formación de complejos entre el FVIII y la preinyección de OPLS. Se prefirió la administración frecuente de dosis bajas de Dexametasona (200 ng/inyección) para evitar la supresión inmune severa de la actividad linfocitaria. Esto fue seguido por un periodo de lavado de 2 semanas. Los animales se reexpusieron entonces agresivamente con cuatro administraciones sc semanales de 1 µg de FVIII libre. En la undécima semana, se sacrificaron los animales y se recolectó sangre en citrato dextrosa ácida (ACD) al 10 %, se centrifugó y se aisló el plasma. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta el análisis. Los niveles totales de títulos anti-FVIII se midieron por ELISA.

Caracterización de BMDC expuesto a FVIII en presencia y ausencia de OPLS: en este conjunto de experimentos se examinaron los efectos de OPLS sobre la maduración fenotípica, el perfil de citoquinas y el potencial migratorio de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) expuestas a FVIII en presencia y ausencia de OPLS.

5 Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC): se aisló la médula ósea de HA nativos de 6 a 8 semanas de edad. En resumen, la médula ósea se cultivó en medio RPMI suplementado con albúmina fetal bovina (baja endotoxina), 2-mercaptoetanol, Pen/Strep y 200 UI/ml de GM-CSF. Los medios se cambiaron los días 3, 6 y 8 de cultivo y las DC se usaron el día 9. Las BMDC son recogidas entonces y se usan según sea necesario. Para verificar la diferenciación de las células de la médula ósea en DCs, se confirmó la expresión superficial de CD11c mediante citometría de flujo usando el anticuerpo anti-CD 11c-FITC con controles de isótopos apropiados.

10 Efecto de OPLS en la maduración fenotípica de BMDC: Luego se investigaron los efectos de OPLS en la maduración fenotípica de BMDC. Las BMDC se expusieron a 1 ug/ml de FVIII en presencia y ausencia de OPLS durante 24 h. Las células se recogieron entonces, se lavaron dos veces con PBS estéril enfriado con hielo y se suspendieron a aproximadamente 1×10^6 células/ml. Las células se bloquearon usando el anticuerpo BD Fc-block antes de marcar con anticuerpos anti-CD40-PE o anti-MHCII-FITC. Las células se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA). Este estudio se realizó por triplicado.

15 Efectos de OPLS en el perfil de citoquinas de BMDCs *in vitro*: Se investigaron los efectos de OPLS en la secreción de citoquinas por las células dendríticas. El día 9, las BMDC, generadas como anteriormente, se trataron con FVIII como un antígeno en presencia de una dosis creciente de OPLS. Los cambios en la producción de citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL12p70, así como la citoquina reguladora TGF- β , se controlaron como una función de la dosis. Las BMDC se expusieron a 1ug/ml de FVIII con dosis crecientes de OPLS (0, 0,5, 1, 10, 25, 50 mM). Se preparó una reserva de 1 M de OPLS añadiendo la cantidad apropiada de OPLS directamente al medio RPMI, y el pH se ajustó usando NaOH estéril 3N e IN. Se utilizaron reservas libres de endotoxinas (kit Endosafe Endochrome-K® Charles River Laboratories, Charleston, SC). Las células se sembraron en placas por cuadruplicado (n= 4) y se cultivaron durante 48 horas. Los medios se recolectaron al final del período de incubación para el análisis de citoquinas. Las concentraciones de TGF- β , TNF- α e IL-12p70 se determinaron utilizando ELISA estándar (R&D System Inc. Minneapolis, MN, EE. UU. o Invitrogen Amarillo, CA).

20 Efecto de OPLS sobre el potencial migratorio de BMDC: Se investigó el efecto de OPLS sobre el potencial migratorio *in vivo* de BMDCs tratadas ex-vivo con FVIII o FVIII/OPLS. El día nueve, se incubaron 3×10^6 células durante la noche con 5 μ g de FVIII o 5 μ g/50 mM de FVIII/OPLS. Al día siguiente, se recogieron células no adherentes y se lavaron dos veces con PBS estéril enfriado con hielo y se marcaron con colorante DiIC(18)5 (Sigma, St. Louis, MO). Las células se incubaron durante 5 minutos a 37 °C con DiIC(18)5 a 2 g/ml (Sigma, St. Louis, MO). Después de 5 min, las células se lavaron dos veces con PBS estéril enfriado con hielo. La incorporación del colorante se confirmó mediante la obtención de imágenes de una muestra de las células con un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200M equipado con una cámara de color AxioCamMRC y un controlador de escenario motorizado LEP. La excitación fue por el canal Cy5 y el filtro de emisión fue de 695/655 nm. (Carl Zeiss Microscopy, LLC. Thornwood, Nueva York).

30 Nueve ratones HA se dividieron en 3 grupos: Ingenuos, FVIII y FVIII/OPLS. El total de células no adherentes recuperadas de arriba se dividió en partes iguales entre los tres ratones en cada grupo de tratamiento y se inyectó por vía subcutánea (sc) en el abdomen inferior. 3 horas después de la inyección, se sacrificaron los animales y se extrajeron los nodos linfáticos inguinales y se fijaron en paraformaldehído al 10 % durante 24 horas. Se tomaron imágenes completas de los nodos linfáticos usando un sistema de generación de imágenes Bio-Rad ChemiDoc MP con un paquete de software ImageLab 4.0.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA).

35 Potencial inmunogénico de BMDC expuesto a FVIII y OPLS/FVIII: Para determinar los efectos de OPLS en la capacidad de BMDC de iniciar una respuesta inmune robusta *in vivo*, se probó el potencial inmunogénico de las BMDC después de la exposición *ex vivo* a FVIII en presencia y ausencia de 50 mM OPLS. En el día nueve, las BMDC se trataron con 5ug FVIII o 5ug/50mM FVIII-OPLS durante 24 h. Luego, se eliminaron los medios y las células se lavaron dos veces con PBS estéril enfriado con hielo. Luego se inyectaron aproximadamente 5×10^5 células/ratón sc en ratones HA, en dos grupos, grupo FVIII y FVIII-OPLS. Esto se realizó una vez por semana durante 3 semanas seguido de un período de lavado de 2 semanas. Al final del período de lavado, los animales fueron sacrificados y se recolectó plasma. Los niveles totales de título anti-FVIII se midieron por ELISA con los valores de corte específicos de la placa calculados a partir en plasma de animales ingenuos.

40 Efecto de OPLS sobre la inmunogenicidad *in vivo* de FVIII: 21 ratones HA entre 6 y 8 semanas de edad se dividieron en 3 grupos. El grupo uno recibió 1 ug de FVIII SC en la región abdominal. Los grupos dos y tres recibieron 1ug FVIII con 0,4 mg de OPLS/inyección (grupo 2) o 5 mg de OPLS/inyección (grupo 3) sc en la región abdominal. Este tratamiento se administró los días 1, 8, 10 y 12. Tres días después de la última inyección, los animales fueron sacrificados. La sangre se recolectó y se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos a 4 grados centígrados. Luego se retiró el plasma y se almacenó a -80 °C hasta el análisis.

45 Estadísticas: se utilizó ANOVA unidireccional no paramétrico con el análisis post hoc de Tukey para el análisis de los valores de los títulos, según corresponda. Se utilizó la prueba t de Student para comparar la intensidad media de fluorescencia (MIF) para los datos de citometría de flujo. El ANOVA unidireccional no paramétrico con análisis post hoc de Kruskal-Wallis se usó para el análisis de los valores de los títulos cuando fue apropiado

60

- Resultados: OPLS induce hiporrespuesta a la reexposición de FVIII en ratones HA: para investigar si OPLS es el componente estructural crítico responsable por inducción de tolerancia, se realizó un estudio de reexposición. Durante la etapa de pretratamiento, tanto OPLS como Dexametasona redujeron la respuesta de anticuerpos anti-FVIII como se esperaba. Al reexponer con FVIII, los animales pretratados con FVIII y FVIII-Dexametasona mostraron una respuesta de anticuerpos anti-FVIII robusta (25438 ± 5275 y 33694 ± 7598 factor de dilución inversa respectivamente, media \pm SEM) en comparación con el animal pretratado con FVIII-OPLS (14712 ± 1853 factor de dilución inversa media \pm SEM, figura 32). Solo el grupo pretratado con OPLS mostró títulos más bajos incluso después de suspender el tratamiento con OPLS, pero tal efecto no se observó en el grupo de tratamiento con Dexametasona.
- Cambios mediados por OPLS a la maduración de BMDC *in vitro*: el mecanismo de procesamiento y presentación de antígenos implica las siguientes etapas secuenciales; La absorción de antígeno por las células dendríticas es la primera etapa para montar una respuesta inmune efectiva. Esto es seguido por la maduración fenotípica, la producción de citoquinas y la migración a linfáticos aferentes para la presentación de células T. Para determinar si OPLS interfiere con el procesamiento y la presentación de antígenos por DC, se monitorizaron sus efectos sobre la maduración fenotípica de BMDC, la secreción de citoquinas y el potencial migratorio.
- OPLS redujo la expresión del marcador coestimulador CD40 en BMDCs *in vitro*: la exposición de BMDC a FVIII dio como resultado un aumento en la expresión de CD40. En presencia de OPLS 50 mM, el número de BMDCs que expresan CD40 cayó de un promedio de 47,8 % en células tratadas con FVIII a 26,5 % en células tratadas con FVIII-OPLS ($n= 3$, $p < 0,05$ figura 2A panel superior), esto también se reflejó en la intensidad de fluorescencia media (MFI) que cayó del promedio de $14,4 \times 10^3$ (unidades fluorescentes arbitrarias) en células tratadas con FVIII a $9,45 \times 10^3$ (unidades fluorescentes arbitrarias) en presencia de OPLS ($n= 3$, $p < 0,05$ figura 2B panel superior).
- Los niveles de expresión de MHCII no se vieron afectados por la exposición de BMDC a OPLS como se ve en la figura 33A y 33B (paneles inferiores). El porcentaje de BMDC que expresó MHCII fue 89,8 % y 89,5 % en ausencia y presencia de OPLS 50 mM respectivamente ($n= 3$). Esto también se reflejó en la intensidad de fluorescencia media (MFI). La MFI promedio de los tres experimentos fue 468×10^3 y 449×10^3 (unidades fluorescentes arbitrarias) para las células tratadas con FVIII y las células tratadas con FVIII-OPLS. ($n= 3$) Este hallazgo sugiere que OPLS no interfiere con el procesamiento y la presentación de FVIII a través del complejo MHCII en BMDC.
- OPLS induce una disminución dependiente de la dosis en las citoquinas proinflamatorias y un aumento en la producción de citoquinas reguladoras por BMDCs: DC expuesto al FVIII en presencia de OPLS mostró una disminución dependiente de la dosis en las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-12p70 ($n= 4$). A 50 mM se observó un cierre total de la producción de citoquinas IL-12p70 y una reducción sustancial en TNF- α (Figura 2C). Esto fue acompañado por un aumento dependiente de la dosis en la citoquina reguladora TGF- β ($n= 4$) (Figura 33D). Estos datos sugieren que BMDC cebada con FVIII y 10 mM o más de OPLS genera un perfil de citoquina similar a una DC tolerogénica (Figura 33C y 33D).
- Efectos de OPLS sobre el potencial de migración de las BMDC: la siguiente etapa en la absorción y el procesamiento de antígenos incluyó la migración de DC desde el tejido a los linfáticos aferentes. Se espera que las DC tolerogénicas tengan una migración mejorada al linfático aferente. Se siguió la migración de BMDC expuesta *ex vivo* a FVIII o FVIII/OPLS en ratones anfitriones HA mediante la incorporación de la etiqueta de membrana fluorescente DiIC18(5). Este tinte solo fluoresce en el ambiente hidrófobo de la membrana celular, cualquier fluorescencia detectada se atribuirá al complejo DiIC(18)5/BMDC y no al tinte libre. Las Figuras 2D y 2E muestran las imágenes de campo brillante de BMDCs expuestas a FVIII (panel superior E) o FVIII/OPLS (panel superior F), los paneles inferiores muestran la misma imagen tomada por el canal Cy5 (filtro de emisión establecido en 695/655). La fluorescencia observada en las membranas de BMDC es una indicación de marcado exitoso con DiIC(18)5. Tras la inyección sc de células BMDCs marcadas con DiIC18(5) en ratones HA, se observó un aumento en la cantidad de fluorescencia recuperada en el nodo linfático inguinal en ratones inyectados con BMDCs tratados con OPLS/FVIII (según lo determinado por el área bajo la curva fluorescente) en comparación con el tratado con FVIII (45254 ± 4240 para OPLS/FVIII versus 26709 ± 5018 para el grupo tratado con FVIII) (Figura 33F). Este aumento es un reflejo directo del número de BMDCs que alcanzaron el linfático debido al potencial migratorio de las células dendríticas cebadas por OPLS.
- OPLS reduce el potencial inmunológico de BMDC expuestas *ex vivo* a FVIII en ratones HA: en este estudio se investigó el efecto de OPLS en la capacidad de BMDCs de iniciar una respuesta inmune al monitorizar la producción de anticuerpos en ratones HA huésped después de la reintroducción de BMDCs tratados *ex vivo*. Nuestro estudio muestra títulos anti-FVIII estadísticamente más altos en ratones inyectados con BMDC tratados *ex vivo* con FVIII en comparación con aquellos inyectados con BMDC tratado con FVIII/OPLS (1894 ± 667 vs. $81 \pm 15,6$ unidades de título arbitrarias respectivamente) (media \pm SEM $p = 0,03$ Figura 34). Es importante tener en cuenta que los ratones de cada grupo no estuvieron expuestos directamente al FVIII, sino a las BMDC que estuvieron expuestas al FVIII o FVIII-OPLS *ex vivo*. Cualquier respuesta desarrollada es el resultado de BMDCs maduras *ex vivo* que presentan el antígeno FVIII al sistema inmune del huésped. Estos datos indican que OPLS deteriora la capacidad de DC para presentar el antígeno de una manera propicia para una respuesta adaptativa efectiva.

Efecto de OPLS sobre la inmunogenicidad *in vivo* de FVIII: la Figura 35 muestra los resultados de la respuesta inmune *in vivo* a FVIII en ratones HA en presencia y ausencia de dosis crecientes de OPLS. Los valores totales de título anti-FVIII en el grupo de tratamiento con FVIII fueron estadísticamente más altos que el título anti-FVIII en animales tratados con dosis altas de OPLS ($285 \pm 3,3$ unidades arbitrarias versus $5,34 \pm 5,8$ unidades arbitrarias respectivamente) (media geométrica \pm desviación estándar sobre la media geométrica) ($p < 0,05$). Los valores de título para el grupo de tratamiento con dosis bajas de OPLS fueron más bajos que el FVIII solo, sin embargo, esta reducción no fue estadísticamente significativa. ($137 \pm 1,4$ vs. $285 \pm 3,3$ unidades arbitrarias de título respectivamente).

Estos datos muestran claramente una respuesta dependiente de la dosis *in vivo* a OPLS. En el presente estudio, OPLS no se complejó con FVIII. Esto permite la administración secuencial mediante la cual OPLS se administra primero para cebar el sistema inmune y luego el biológico se administra en segundo lugar.

La tolerancia es inducida por DCs tolerogénicas. Se cree que las células dendríticas tolerógenas se generan *in vivo* en respuesta a un evento apoptótico. Son fenotípicamente distintos de las DC inmaduras residentes en los tejidos. Se caracterizan por un aumento en la producción reguladora de citoquinas y una menor secreción de citoquinas proinflamatorias. Muestran cierto grado de maduración así como pérdida de moléculas de adhesión. Esto último es necesario para la migración del tejido hacia los linfáticos aferentes. En los linfáticos aferentes, estas DC pueden presentar antígenos a las células T en ausencia de marcadores coestimuladores que den como resultado la falta de respuesta de las células T. Nuestros datos (figura 33) apoyan la formación de DC tolerogénica en respuesta a OPLS. Esto se basa en nuestra observación del perfil de citoquinas alterado y la subregulación del marcador coestimulador CD40 mientras se mantienen los niveles de expresión de MHCII, todos los cuales están de acuerdo con las características tolerogénicas de DC.

Tanto las DC inmunogénicas como tolerogénicas pueden migrar a los linfáticos aferentes. En la figura 2G se observa un aumento en la cantidad de BMDC marcado con fluorescencia recuperado en el nodo linfático inguinal de ratones inyectados con BMDC expuestos a FVIII/OPLS en comparación con FVIII solo. Al llegar a los linfáticos, se espera que las DC presenten el antígeno a través de MHC I o MHC II a las células T. El contexto de esta presentación dicta el resultado de esta interacción. Las DC tolerogénicas pueden presentar el antígeno a las células T en ausencia de marcadores coestimuladores, tal como el CD40, lo que resulta en tolerancia. La tolerancia debería traducirse en un potencial inmunogénico reducido *in vivo*. Los datos presentados en la figura 3 respaldan esta noción. Las BMDC expuestas, *ex vivo*, a FVIII solo no perdieron su potencial inmunogénico una vez transferidas de nuevo a los ratones HA huésped. Este no fue el caso de las BMDC tratadas con FVIII/OPLS. Esto indica que la exposición a OPLS redujo el potencial inmunológico de las BMDC.

Los datos presentados en esta divulgación muestran que la reducción observada en los títulos de anti-FVIII en ratones HA tratados con OPLS/FVIII es el resultado de la inmunorregulación por OPLS y no de la inmunosupresión. Adicionalmente, estos datos mostraron que, a diferencia de los animales pretratados con Dexametasona, los animales pretratados con OPLS tuvieron hiporespuesta a la reexposición con FVIII libre. Esto no solo indica que OPLS es un modulador inmunitario, sino que también indica que la hiporespuesta al FVIII era específica del antígeno. Esta especificidad antigénica requiere el procesamiento y la presentación de FVIII por parte de las DC en el contexto de una expresión de CD40 disminuida acompañada de una producción de TGF- β incrementada y una producción de TNF- α e IL-12p70 reducida por DC en respuesta a OPLS. Esto está respaldado adicionalmente por nuestros datos de citometría de flujo que no muestran cambios en la expresión de MHCII en respuesta a OPLS. Esto imita las propiedades de las DC tolerogénicas. Esto se acompaña de un aumento en el potencial migratorio de DC en respuesta a OPLS y un potencial inmunogénico reducido de las DC. En conjunto, nuestros datos indican que OPLS tiene las propiedades estructurales críticas necesarias para alterar la maduración de DC, lo que lleva a la generación de las DC con propiedades tolerogénicas.

Las propiedades tolerogénicas de OPLS se pueden utilizar en una estrategia de vacunación reversa en la que la administración de dosis bajas de proteína terapéutica con OPLS desensibilizará el sistema inmune del paciente a la administración subsecuente de la proteína reduciendo efectivamente la inmunogenicidad de la proteína terapéutica. Se observa que este enfoque puede usarse para inducir tolerancia y reducir la inmunogenicidad hacia la alfa-glucosidasa ácida (GAA) en modelos de enfermedad de pompe murina, lo que sugiere que este enfoque es generalizable. Esta estrategia de vacunación reversa con OPLS ofrece ventajas sobre la terapia inmunosupresora concomitante, tal como la dexametasona, al ofrecer tolerancia específica al antígeno en lugar de la supresión inmunitaria general.

Si bien la divulgación se ha descrito a través de realizaciones específicas, las modificaciones de rutina serán evidentes para aquellos con experiencia en la técnica. Tales modificaciones están destinadas a estar dentro del ámbito de esta divulgación.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en un procedimiento para inducir tolerancia inmune hacia un antígeno proteico, en la que:
 - 5 la composición es una de una primera composición o una segunda composición, en la que la primera composición comprende O-fosfo-L-serina (OPLS), y la segunda composición comprende el antígeno proteico, en la que la primera composición está libre del antígeno proteico y la segunda composición está libre de OPLS; y
el procedimiento comprende administrar la composición y la otra de la primera o segunda composición por separado a través de una ruta subcutánea a un individuo; en el que las dos composiciones se administran en sitios anatómicos que están separados menos de 5,08 cm entre sí y dentro de 60 minutos entre sí.
- 10 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la primera y la segunda composiciones se administran concomitantemente.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la primera y la segunda composiciones se administran secuencialmente.
- 15 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la primera composición se administra antes de la segunda composición o la primera composición se administra después de la segunda composición.
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que OPLS se administra a una concentración de más de 20 mM.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que OPLS se administra a una concentración de 20 a 300 mM.
- 20 7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la osmolalidad de la primera y la segunda composición es de 300 a 1.100 mmoles/kg.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la primera y la segunda composiciones se administran al menos una vez a la semana durante un máximo de 12 semanas.

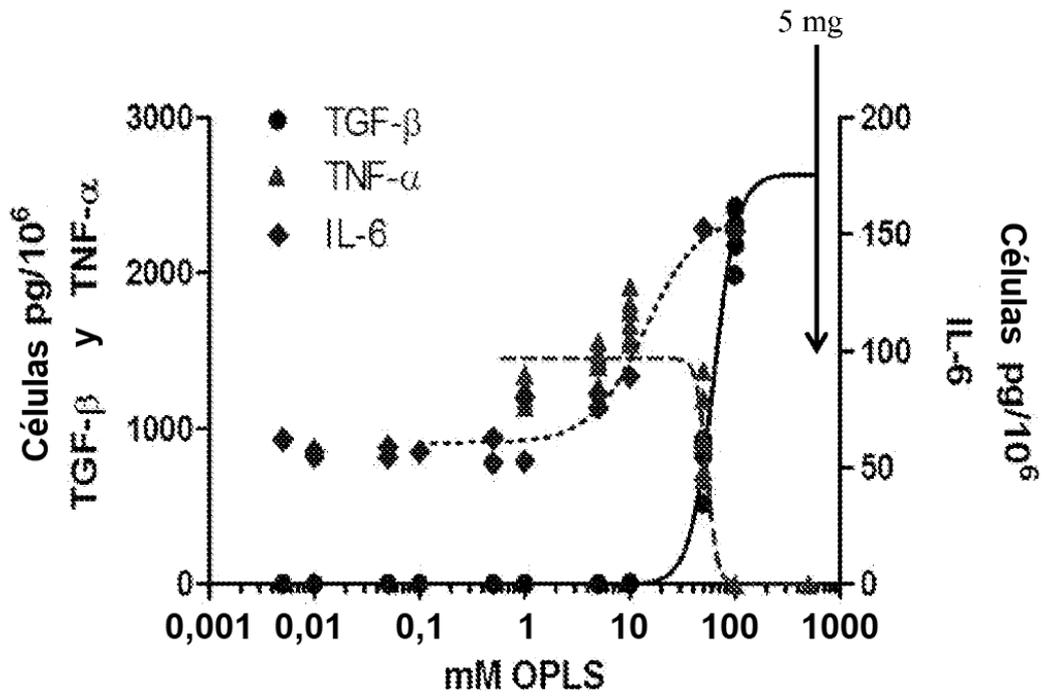
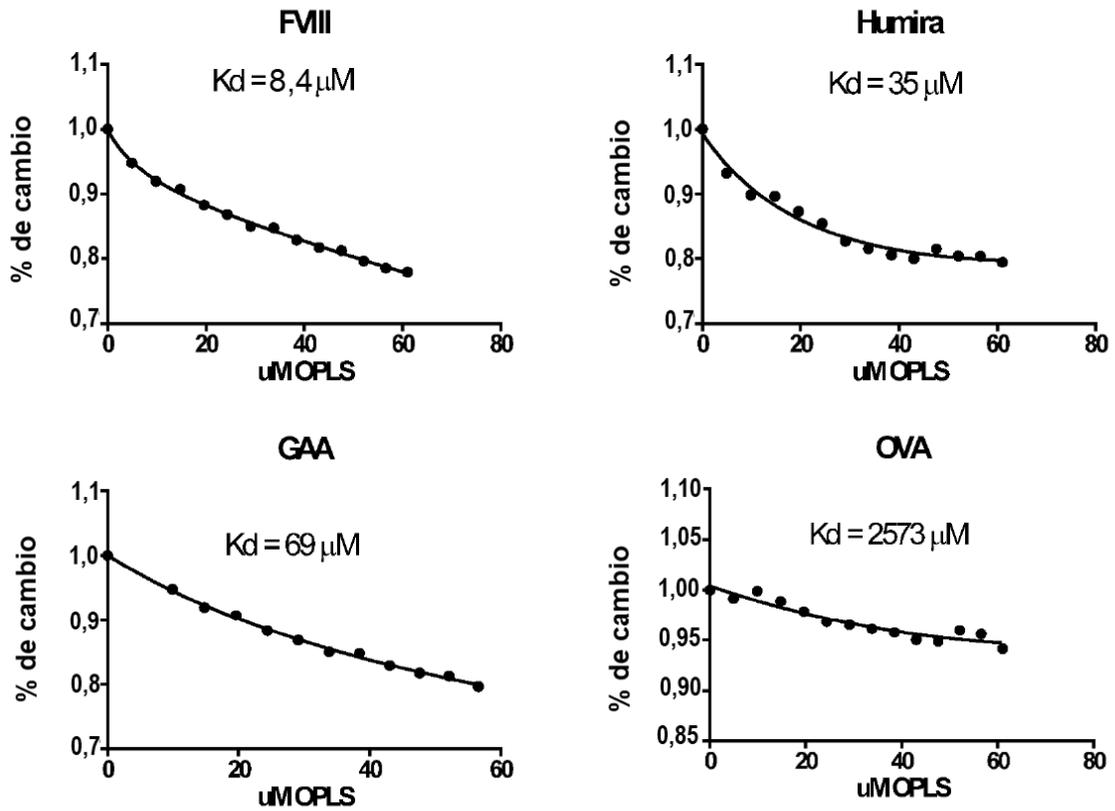


Figura 1



Proteína	Kd (μ M)
FVIII	8,4
Humira	35
Gaa	69
OVA	2573

Figura 2

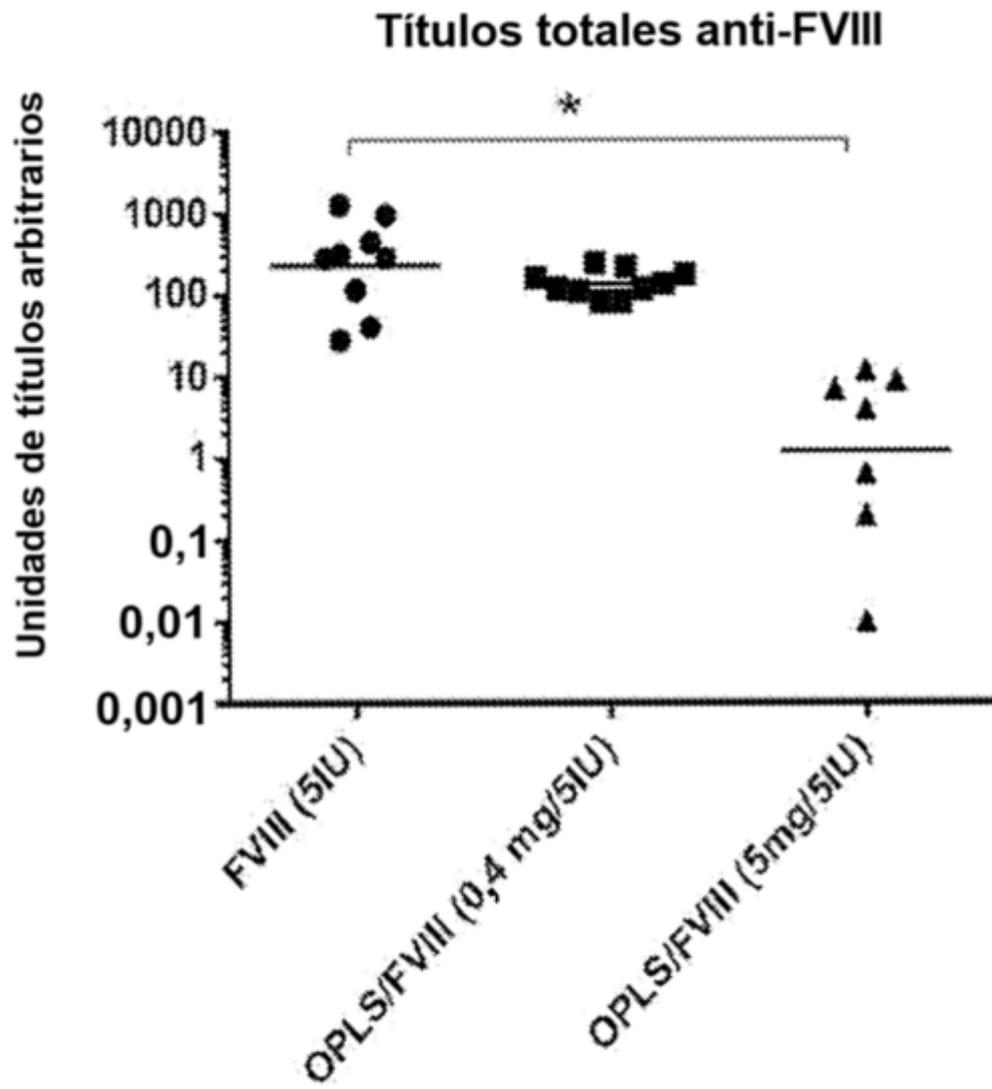


Figura 3

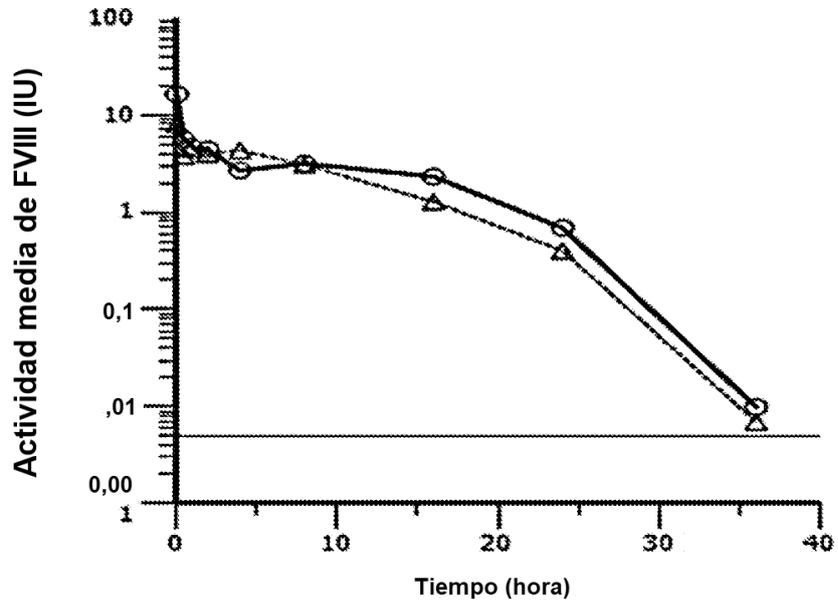


Figura 4

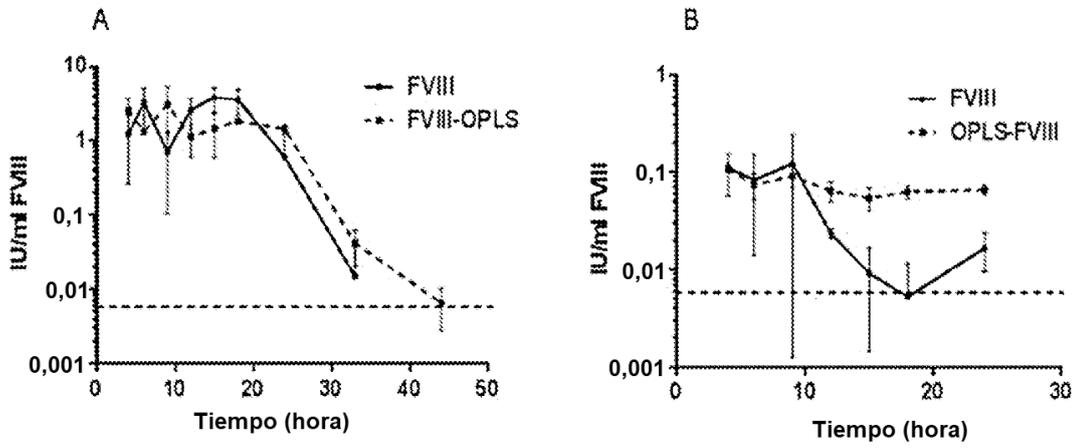


Figura 5

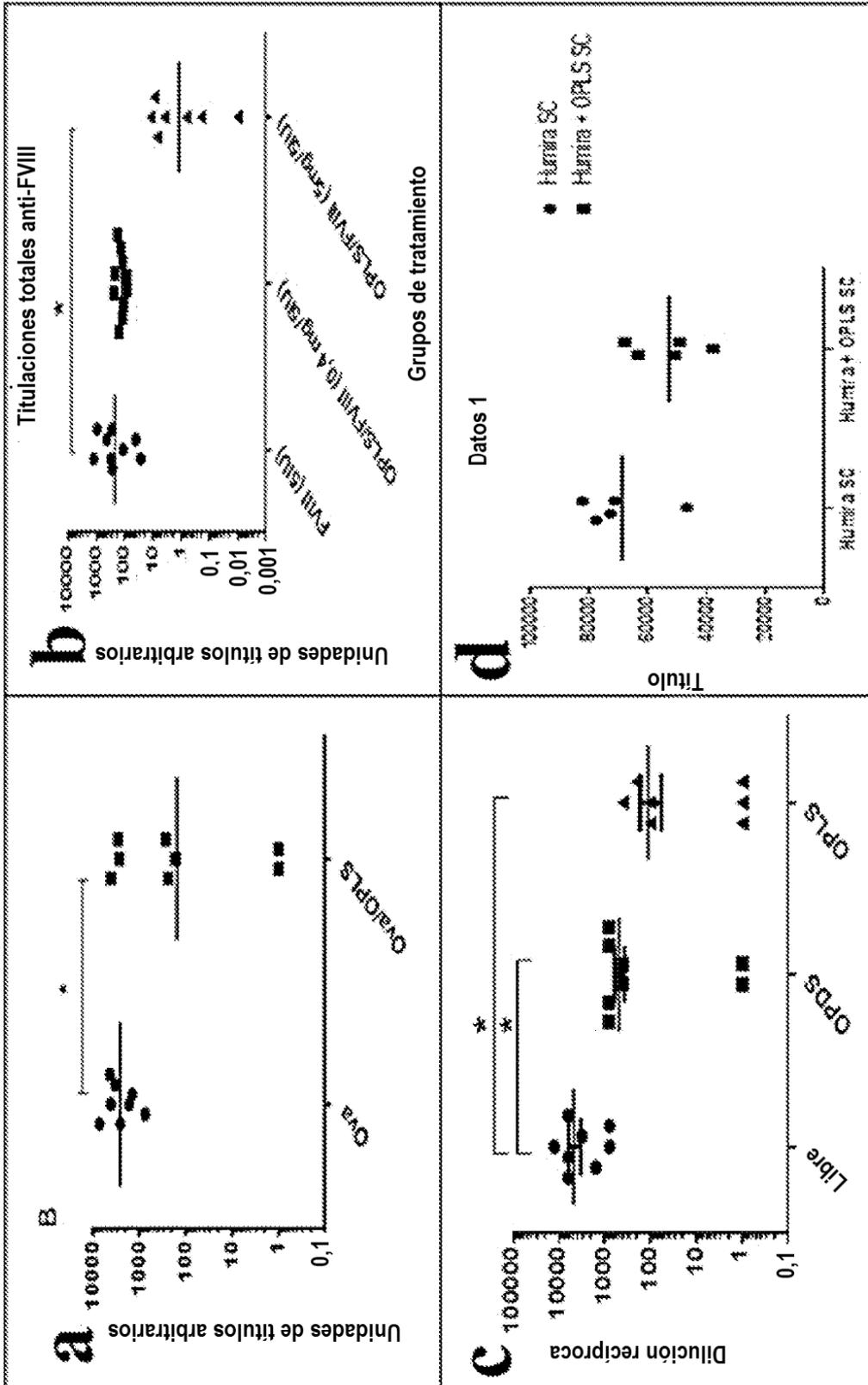


Figura 6

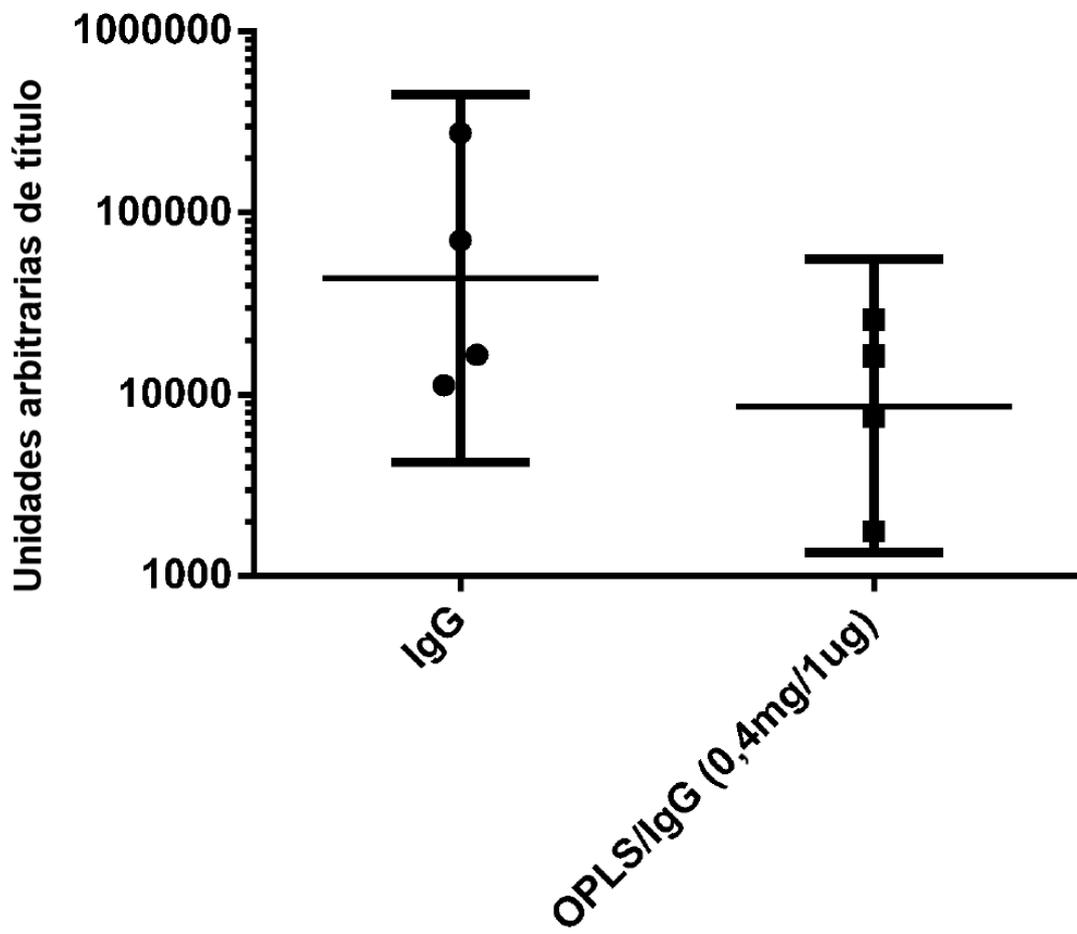


Figura 7

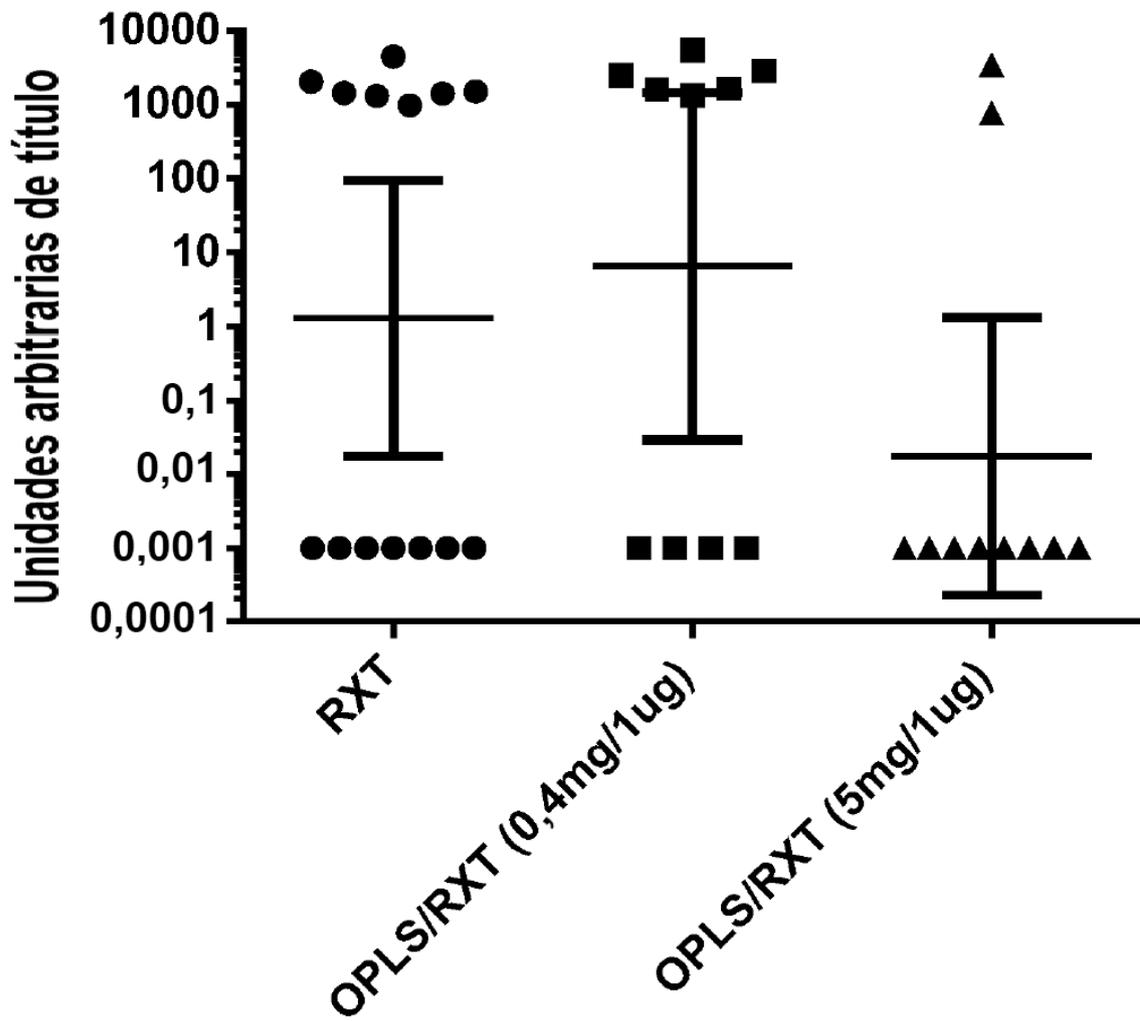


Figura 8

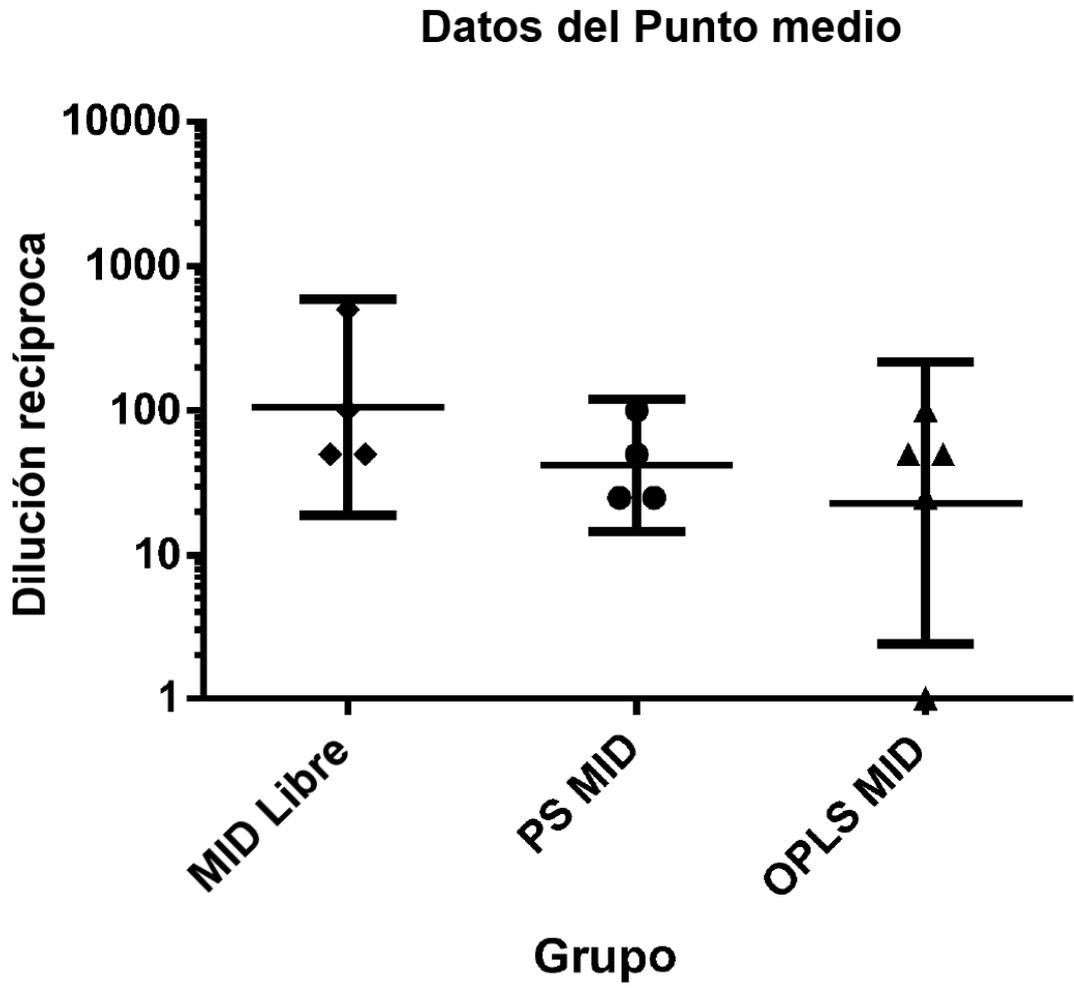


Figura 9

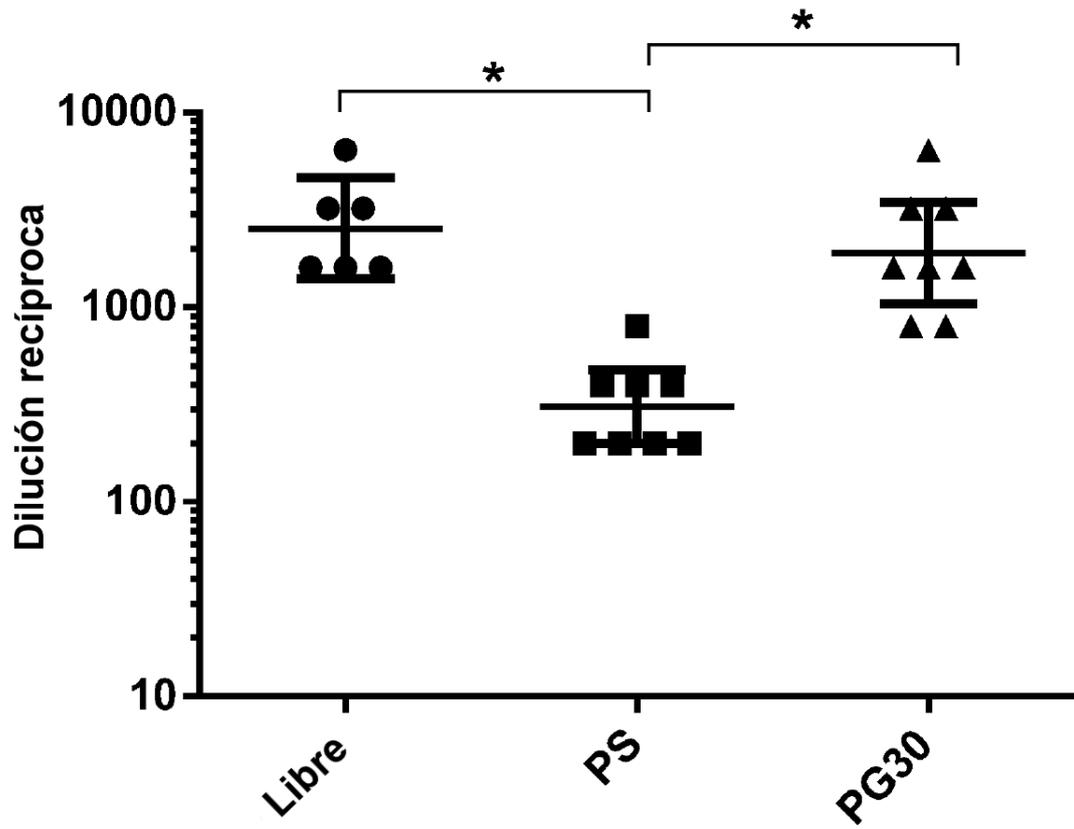


Figura 10

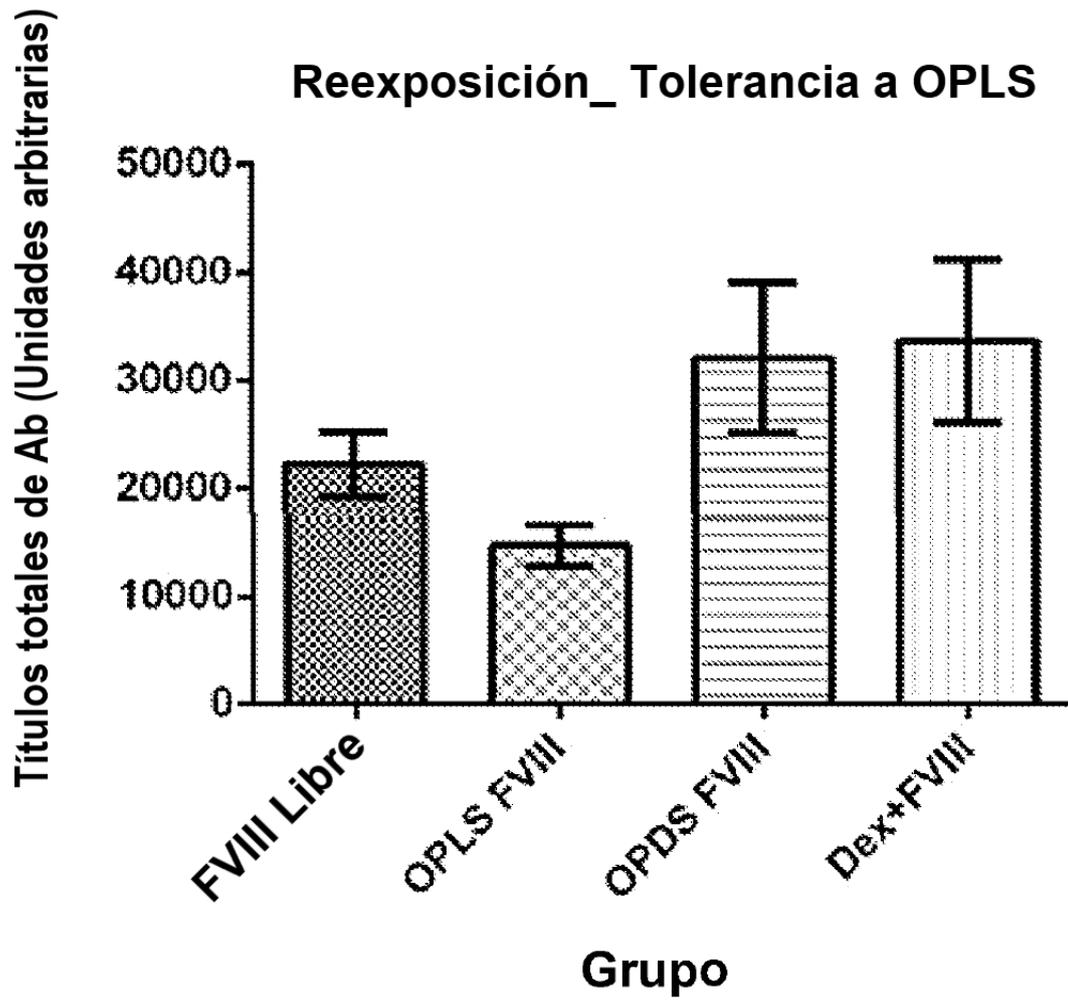


Figura 11

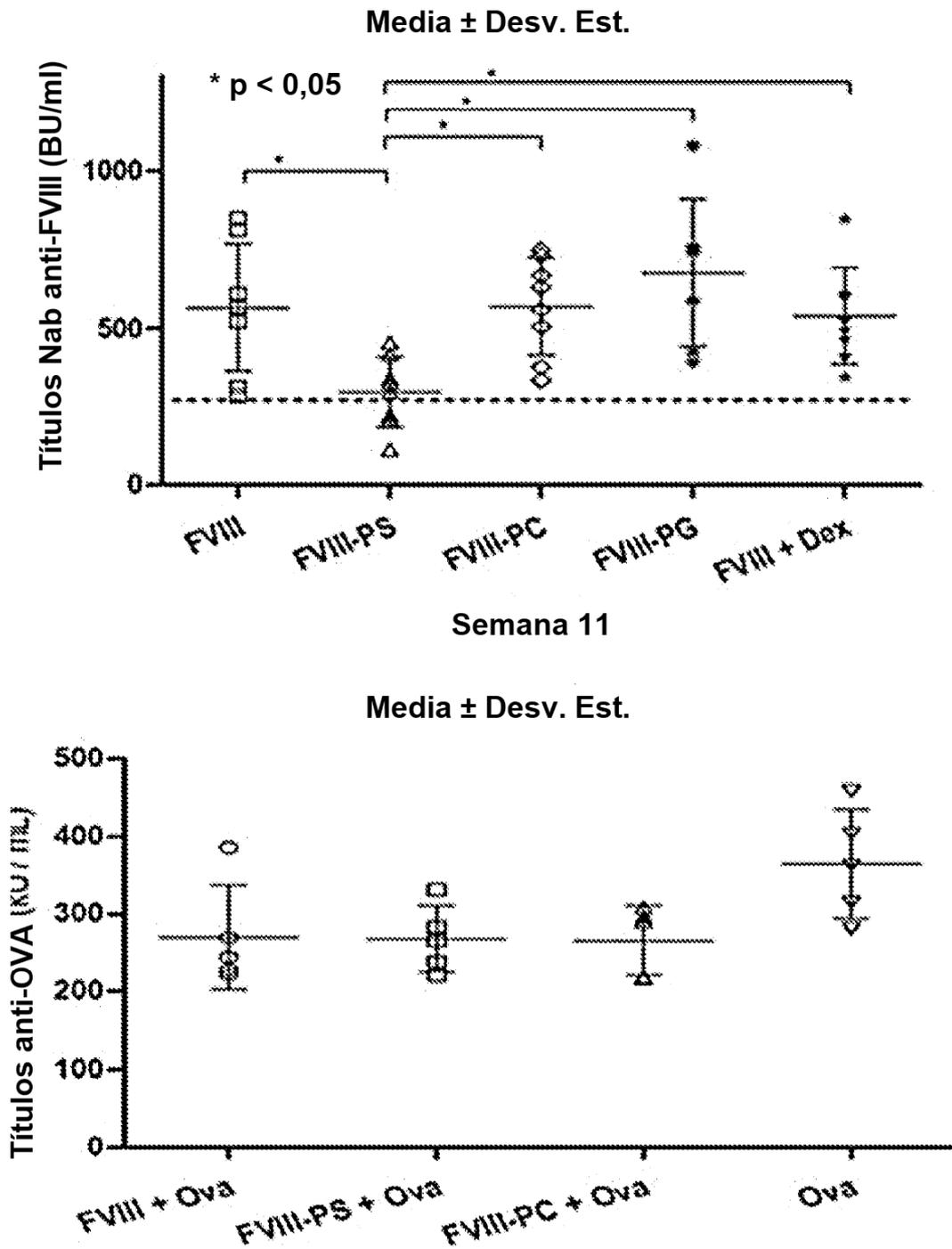


Figura 12

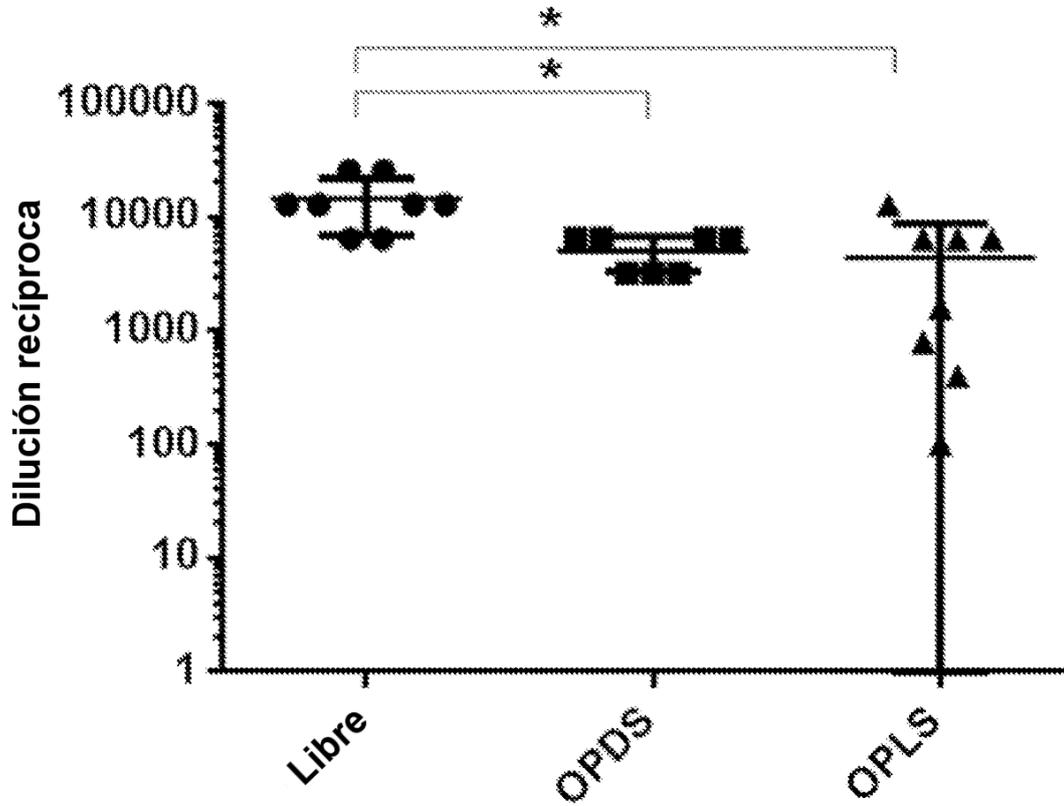


Figura 13

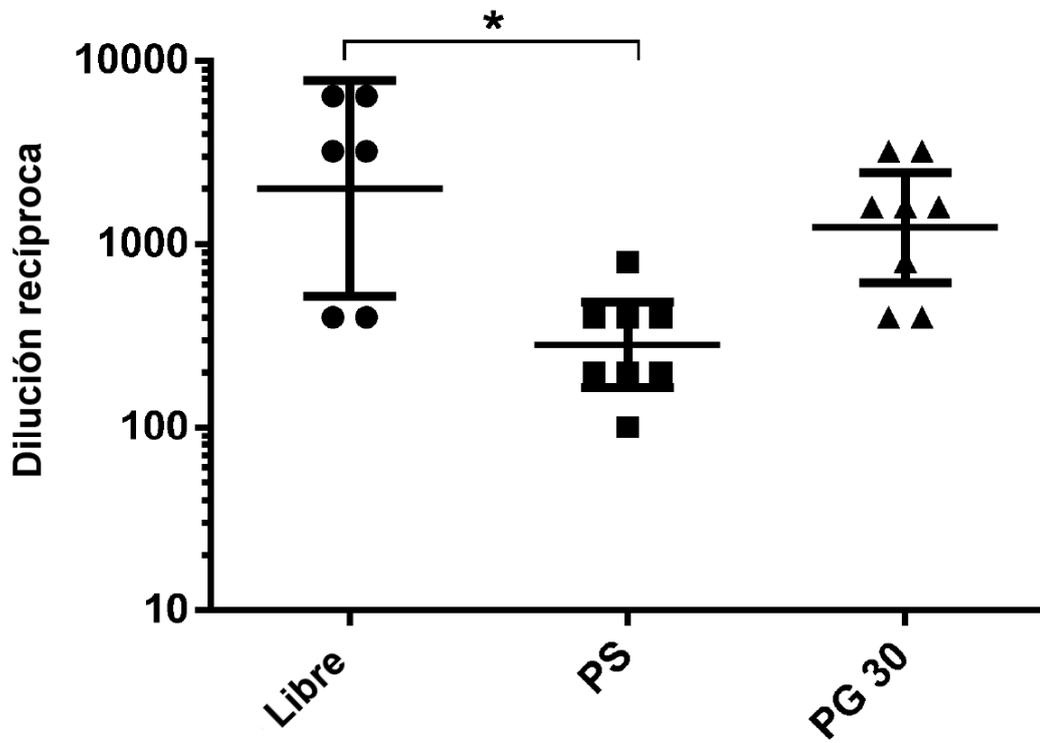


Figura 14

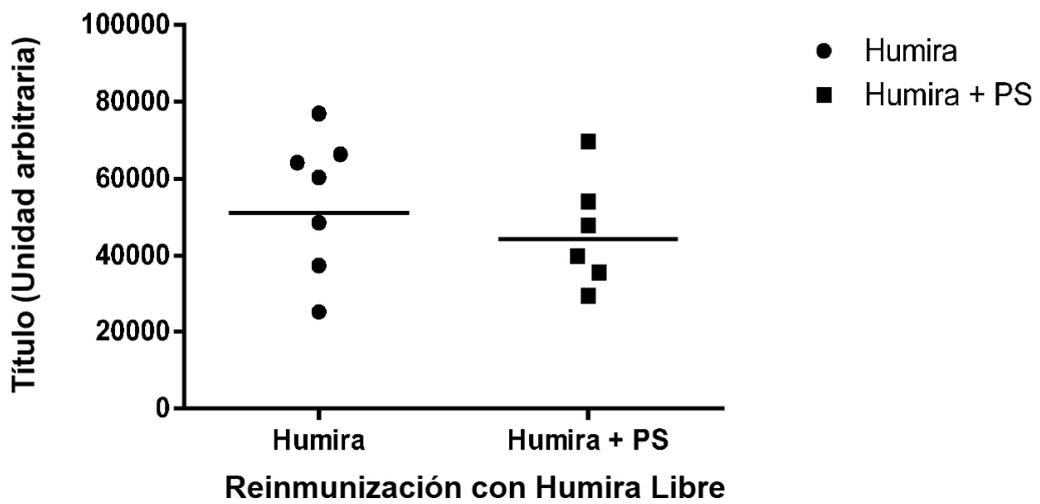


Figura 15

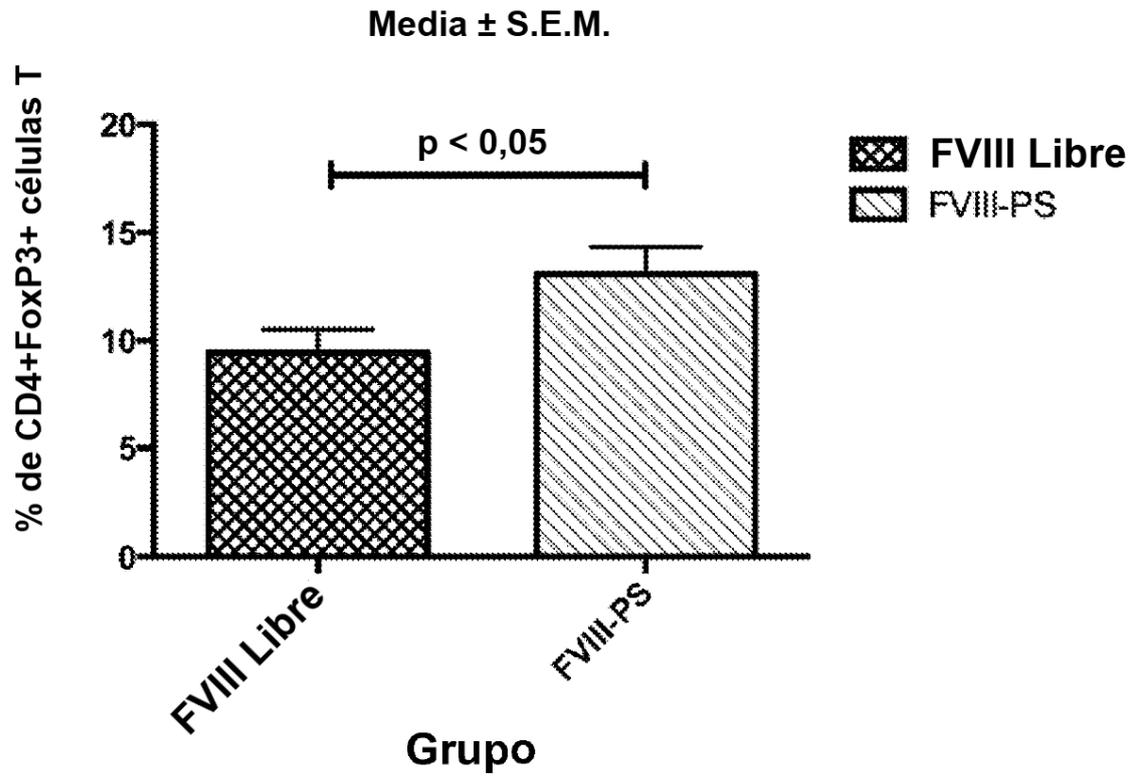


Figura 16

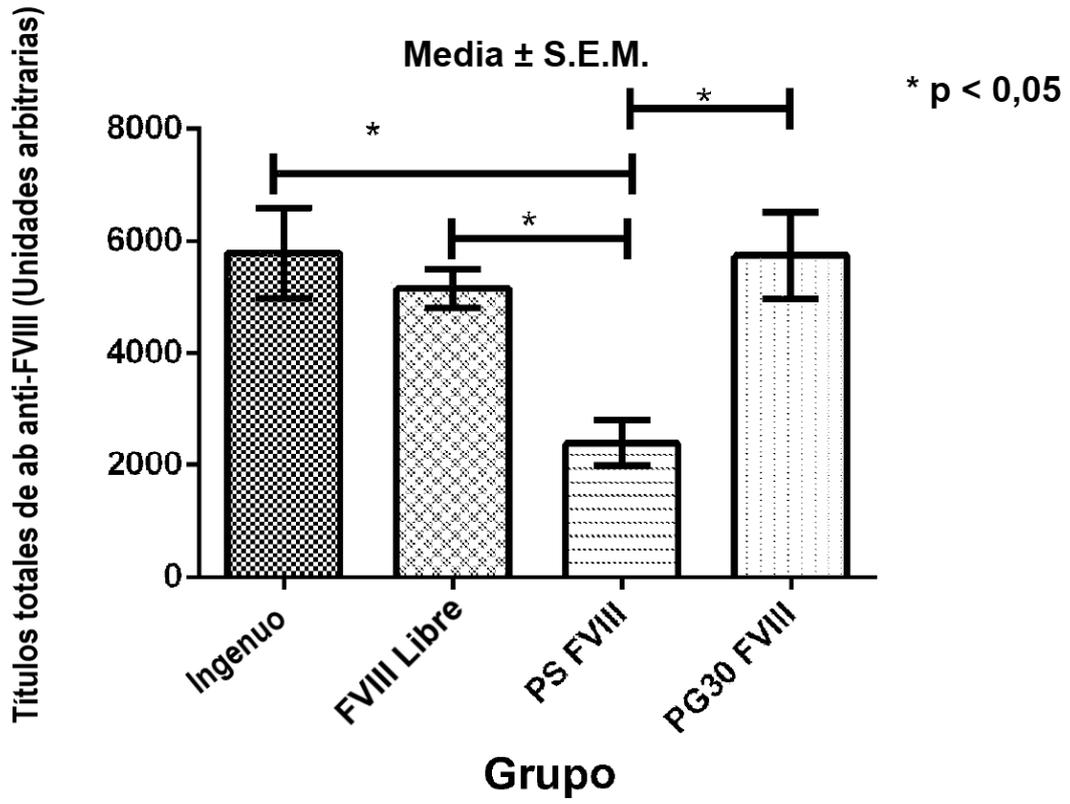


Figura 17

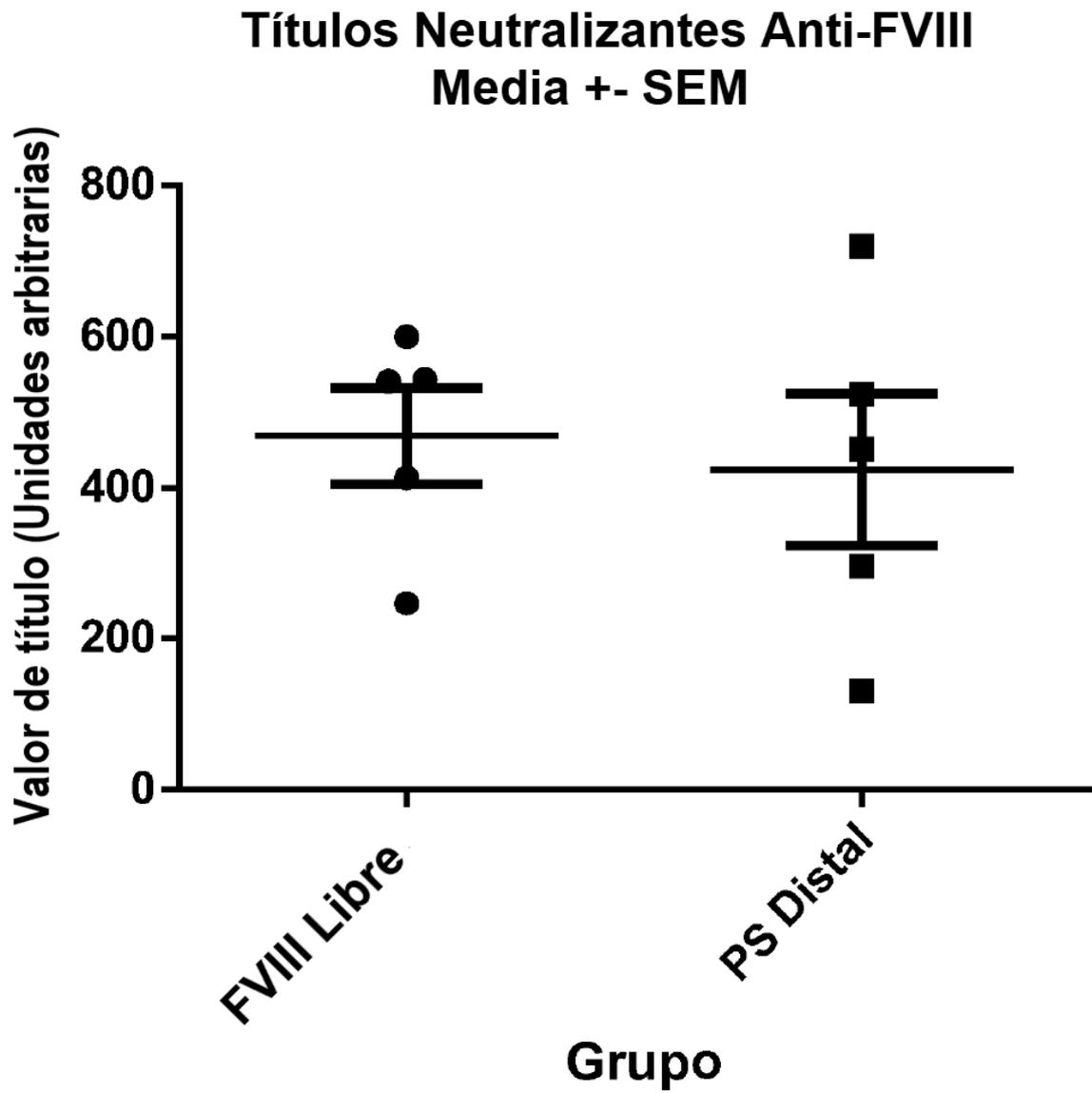


Figura 18

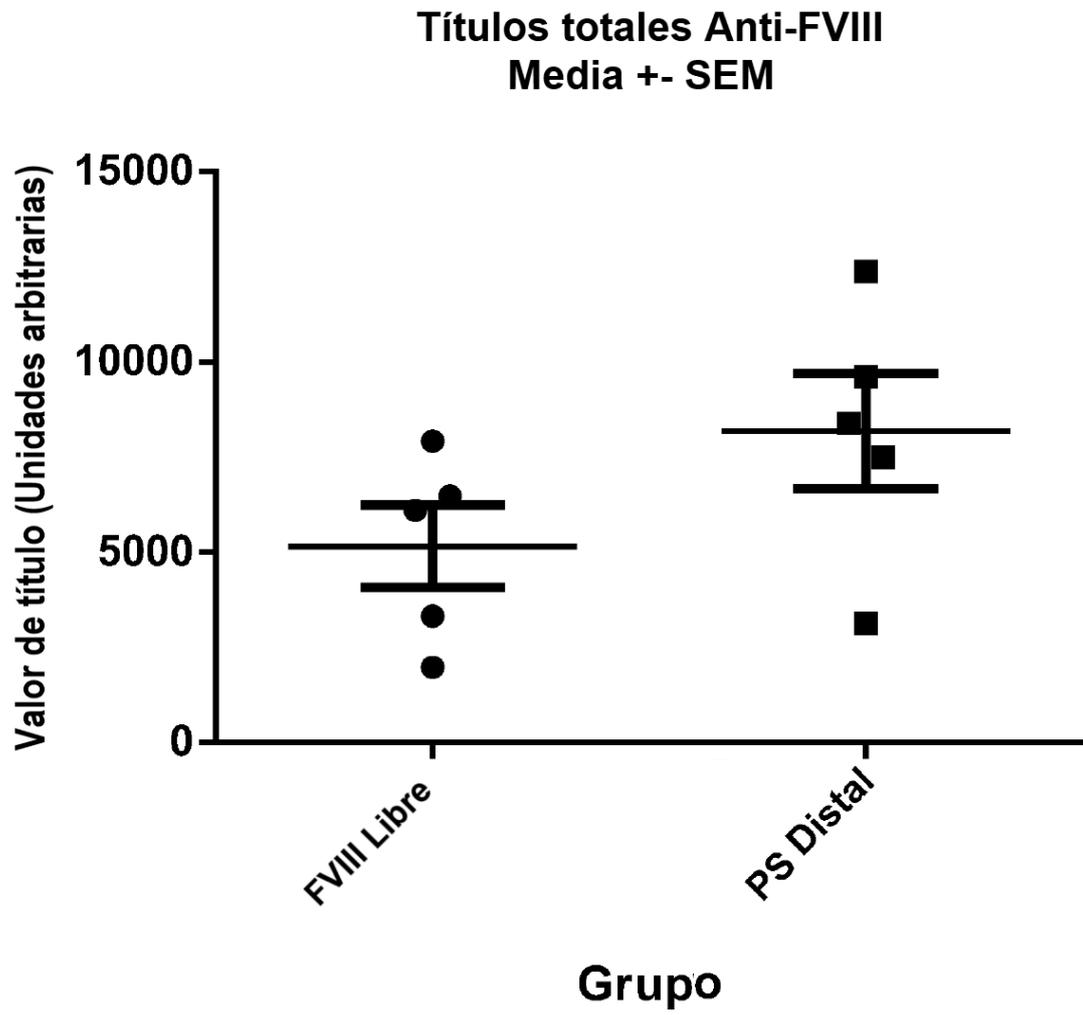


Figura 19

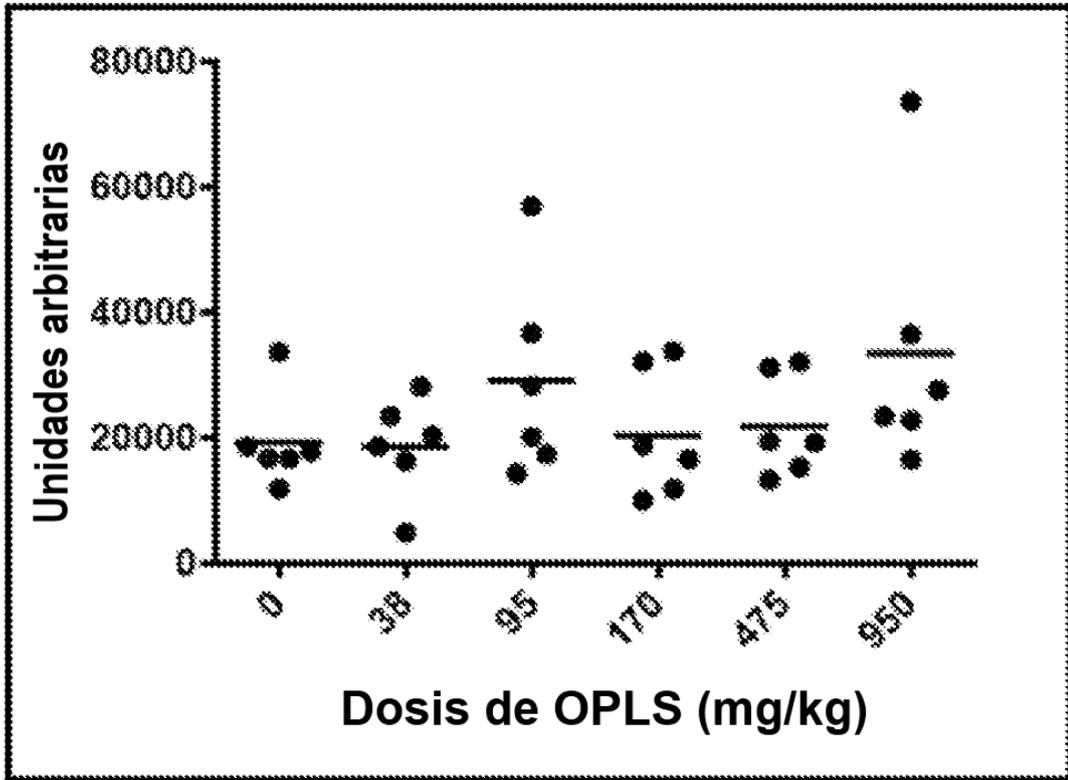


Figura 20

	Media(SD)					
	Vehículo	38 mg/kg OPLS	95 mg/kg OPLS	190 mg/kg OPLS	475 mg/kg OPLS	950 mg/kg OPLS
ALB(g/dL)	2,57(0,06)	2,93(0,15)	2,90(0,20)	2,87(0,23)	2,93(0,12)	2,67(0,06)
ALP(U/L)	35,67(6,51)	64,00(14,53)	67,00(26,89)	48,67(18,15)	28,03(23,54)	49,67(11,93)
ALT(U/L)	31,00(6,08)	35,67(17,67)	26,67(6,03)	37,67(10,07)	46,00(25,71)	32,33(9,81)
AMY(U/L)	1014(149,5)	1043(29,51)	996,00(29,46)	989,67(62,40)	1048,00(58,81)	969,33(42,16)
TBIL(mg/dL)	0,30(0)	0,33(0,06)	0,30(0,00)	0,33(0,06)	0,33(0,06)	0,30(0,00)
BUN(mg/dL)	16,67(1,15)	18,00(2,00)	16,67(2,08)	15,00(3,46)	15,67(3,21)	12,67(2,89)
CA(mg/dL)	5,53(0,29)	5,57(0,21)	5,77(0,21)	5,73(0,25)	5,93(0,70)	5,03(0,12)
PHOS(mg/dL)	5,70(0,60)	5,77(0,67)	5,83(0,90)	5,50(0,95)	5,67(1,03)	5,70(0,85)
K(mg/dL)	3,67(0,15)	3,33(0,25)	3,70(0,20)	3,90(0,30)	3,87(0,25)	3,80(0,00)
TP(mg/dL)	4,60(0,14)	4,60(0,20)	4,70(0,10)	4,80(0,20)	4,80(0,17)	4,67(0,15)

Figura 21

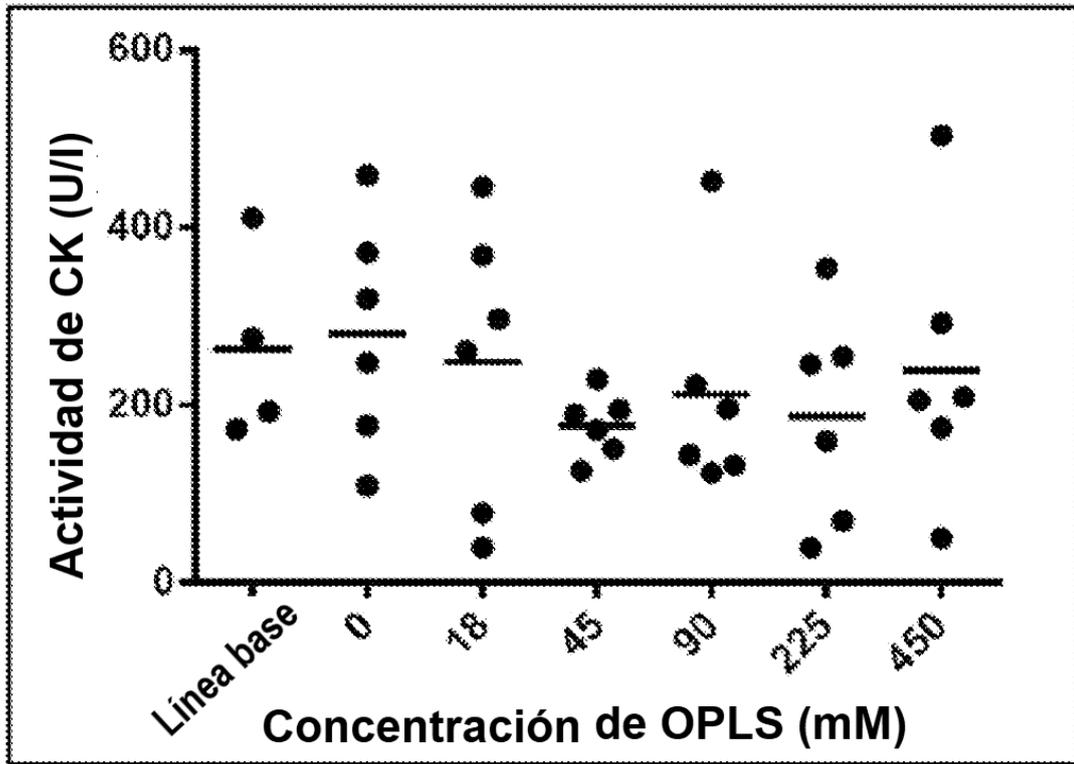


Figura 22

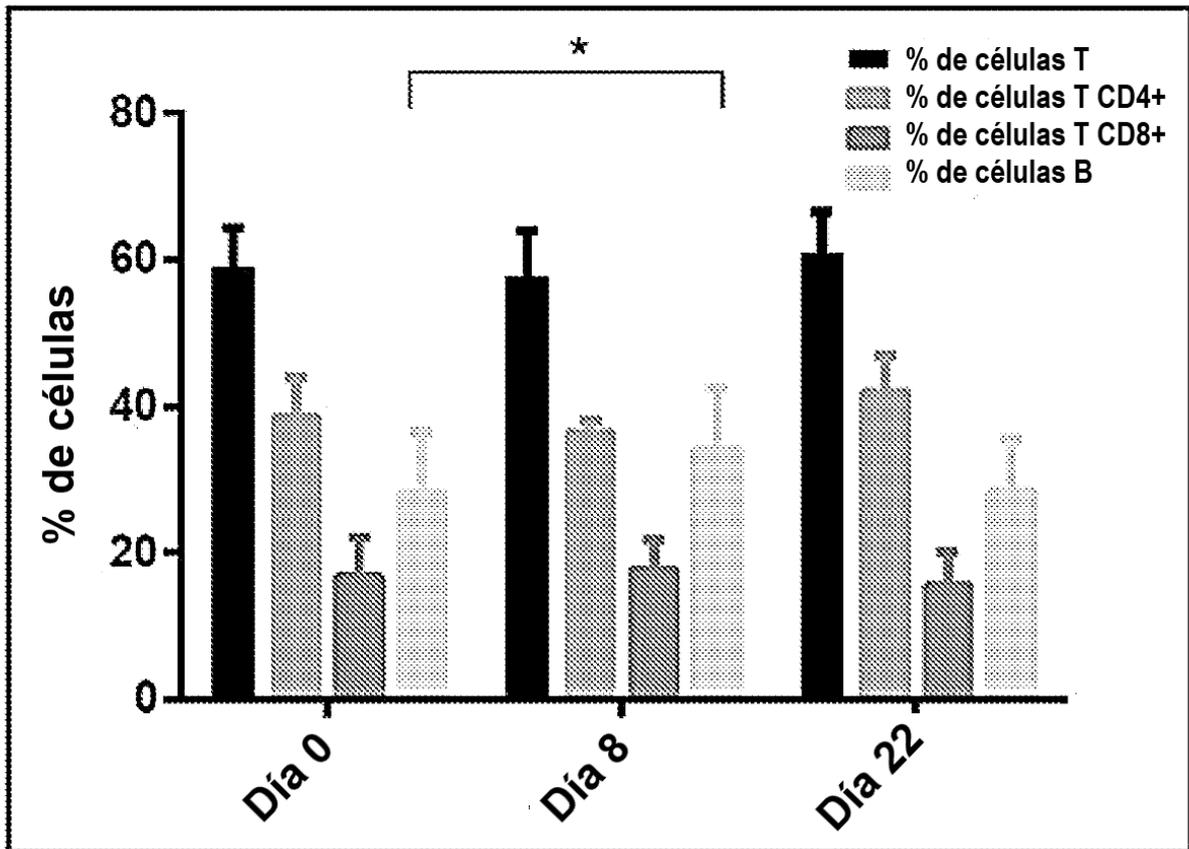


Figura 23

	Media (SD)		
	Día 0	Día 8	Día 22
Sodio (mEq/L)	148(2,65)	149(1,41)	149(2,83)
Potasio (mEq/L)	4,17(0,72)	4(0,14)	4,05(0,07)
Cloruro (mEq/L)	110(1)	112,50(0,71)	110(2,83)
Proteína total (g/dL)	6,17(0,35)	6,95(0,07)	6,70(0,14)
Albumina (g/dL)	4,20(0,26)	4,4(0)	4,30(0,14)
Globulina (g/dL)	1,97(0,15)	2,55(0,07)	2,4(0)
Relación A/G	2,17(0,15)	1,75(0,07)	1,8(0)
Calcio (mg/dL)	9,37(0,5)	9,6(0,28)	10,5(0,14)
Bilirrubina total (mg/dL)	0,13(0,06)	0,14(0,04)	0,09(0,02)
BUN (mg/dL)	15,33(2,52)	15(0)	15,5(2,12)
Glucosa (mg/dL)	77,3(16,77)	66,50(3,54)	79,5(17,68)
Creatinina (mg/dL)	0,63(0,11)	0,64(0,03)	0,69(0,11)
Fósforo (mg/dL)	6,13(0,45)	6,25(0,07)	4,90(0,14)
ALP (mg/dL)	517(112,93)	525,50(10,61)	376(18,38)
ALT (SGPT) (U/L)	34(13,23)	53,50(19,09)	45(2,83)
AST (SGOT) (U/L)	72,67(68,25)	51(29,7)	44(5,66)
LDH (U/L)	852,33(729,29)	443,50(79,90)	463,5(31,82)
Colesterol (mg/dL)	160,67(58,77)	185(35,36)	176(35,36)
Relación BUN/Creat	25,27(8,95)	23,45(1,06)	22,7(0,42)

Figura 24

Tabla

Relación de proteína a OPLS

Proteína	Relación molar aproximada
FVIII/OPLS 1µg/5mg	1:8,00E+06
FVIII/OPLS 1µg/0,4 mg	1:6,00E+05
Humira/OPLS 10 µg/5mg	1:5,00E+05
IgG humana/OPLS 1µg/0,4 OPLS	1:3,25e+05
Rituximab/OPLS 1µg/5mg	1:4,00E+06
Rituximab/OPLS 1µg/0,4mg OPLS	1:3,25E+05
Péptido GAA	1:4,00E+03
GAA	1:3,00E+06
OVA	1:1,5E+06

Figura 25

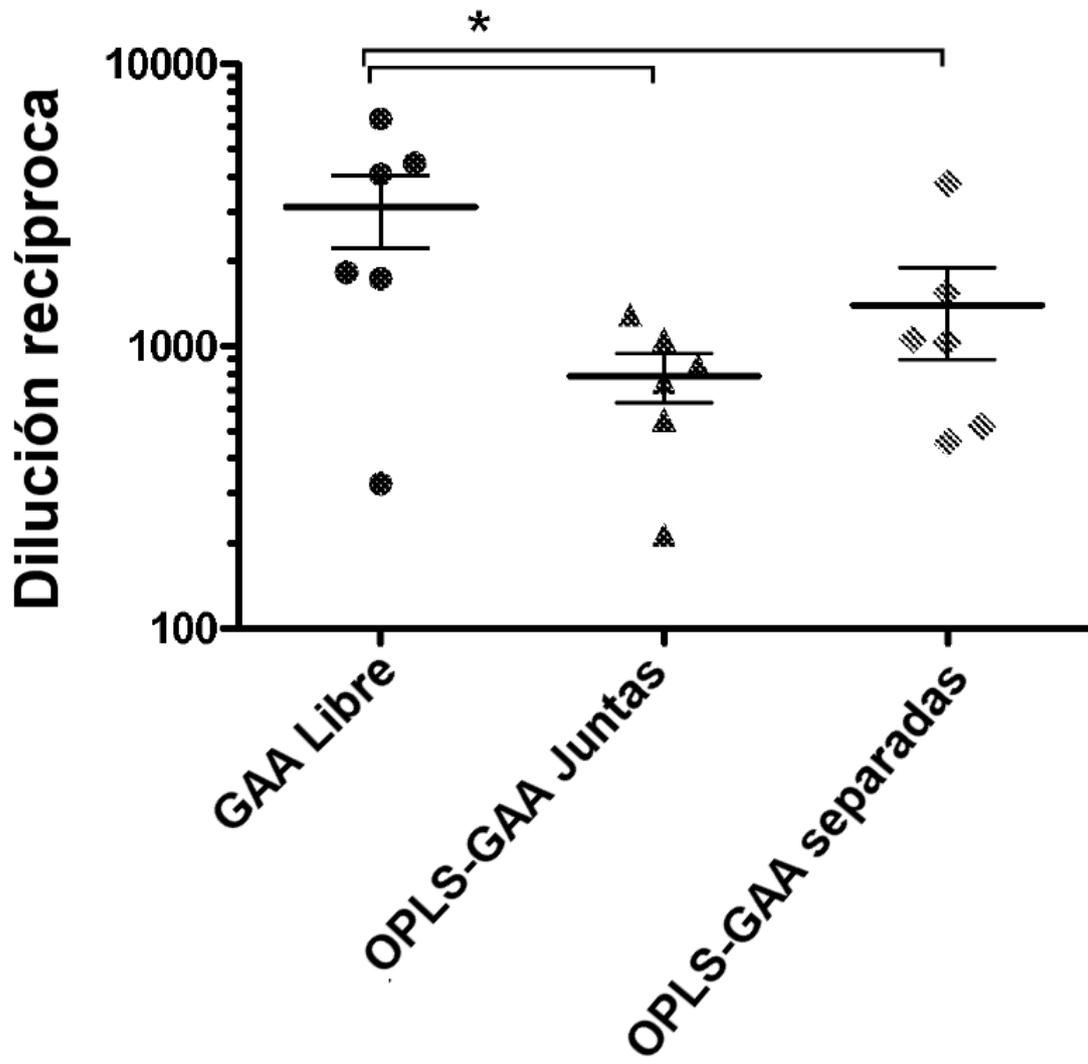


Figura 26

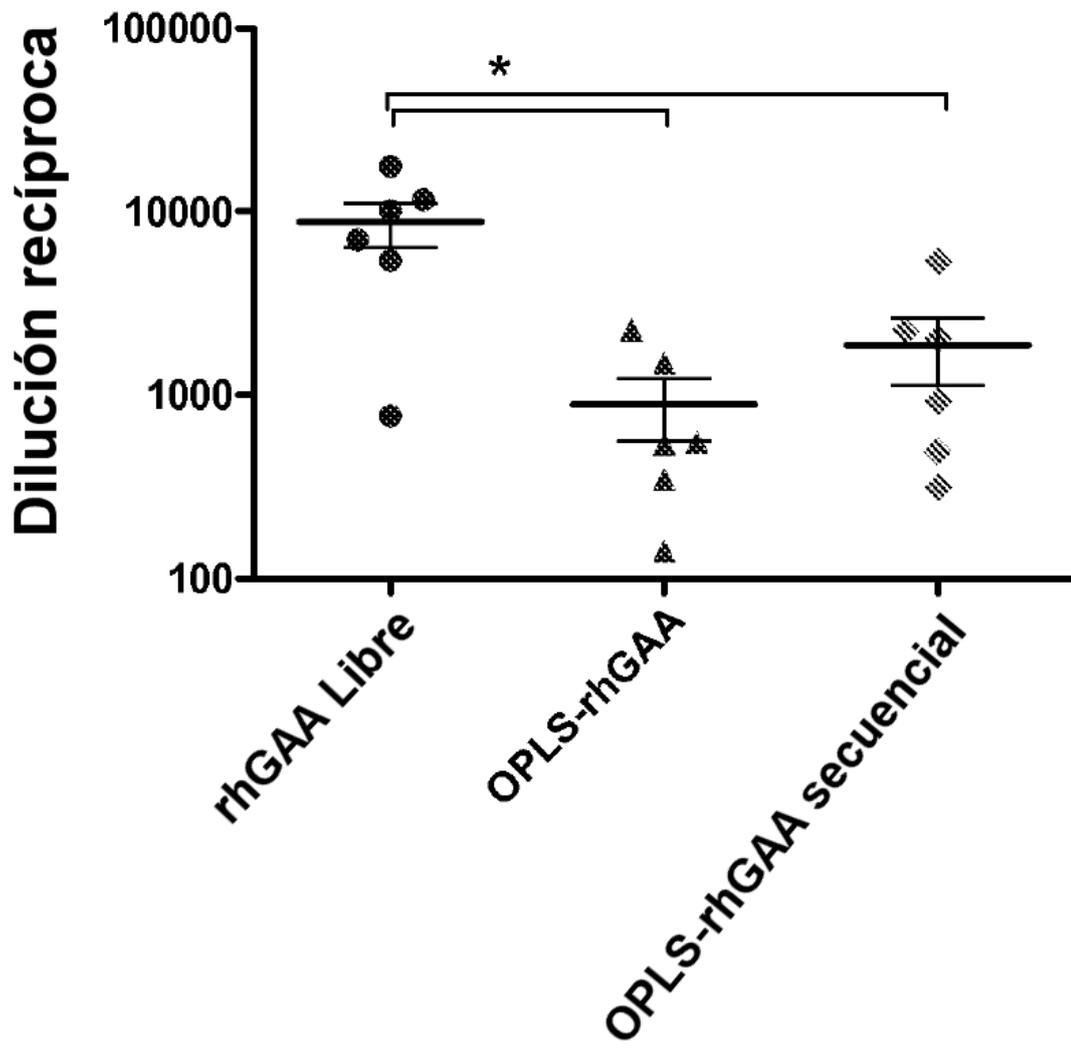


Figura 27

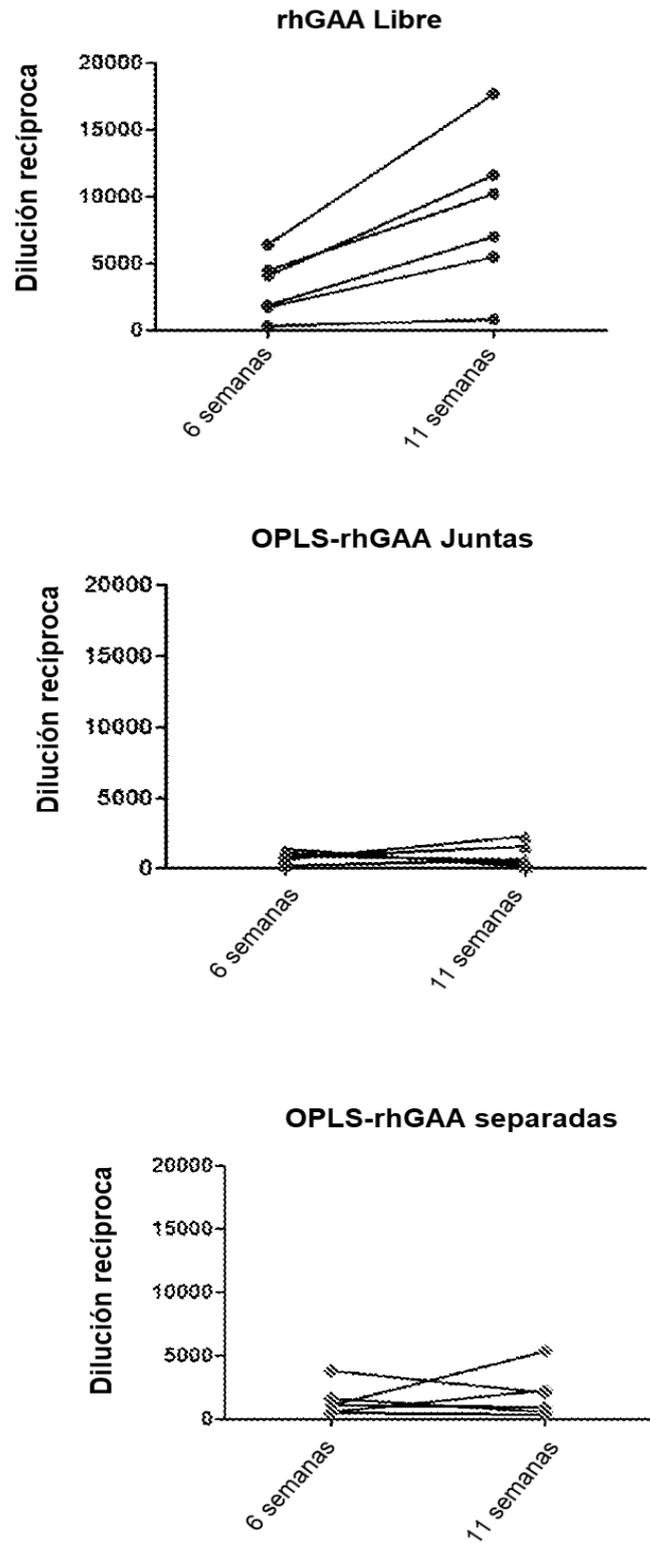


Figura 28

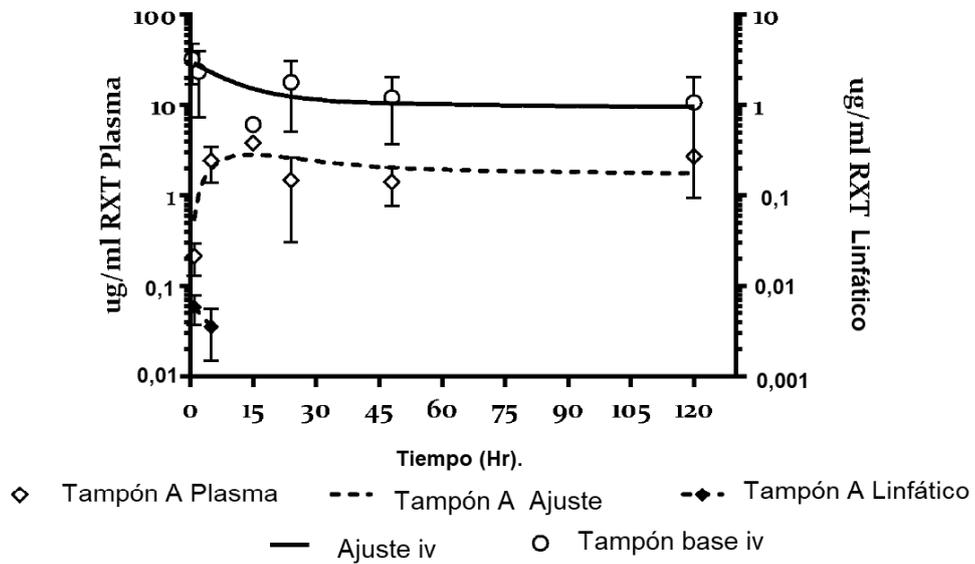


Figura 29

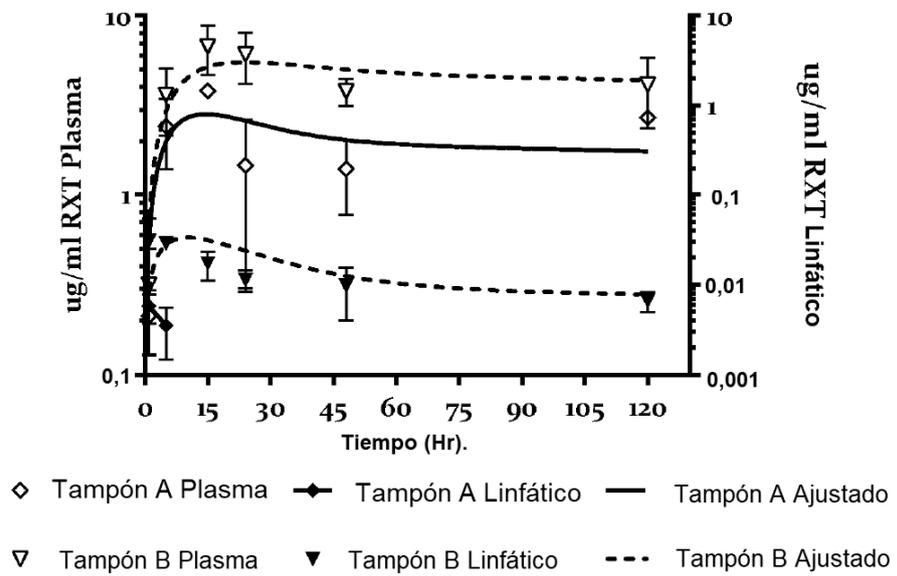


Figura 30

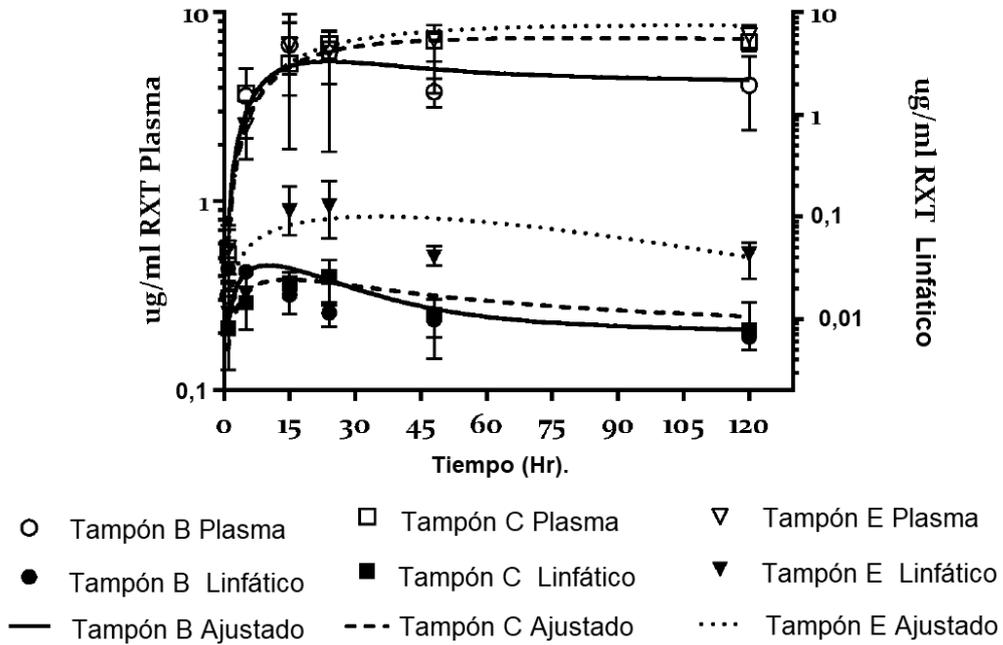


Figura 31A

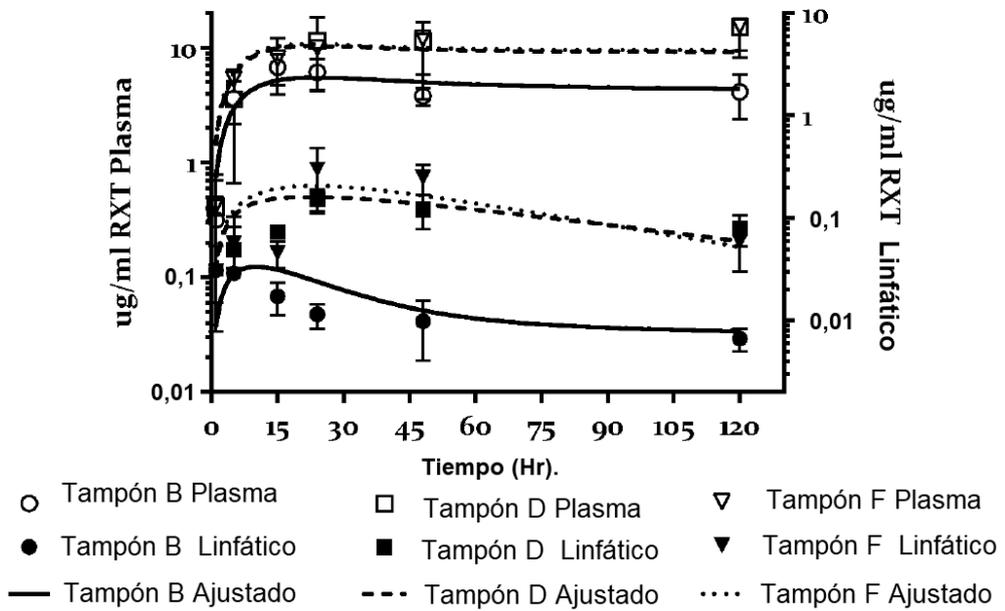


Figura 31B

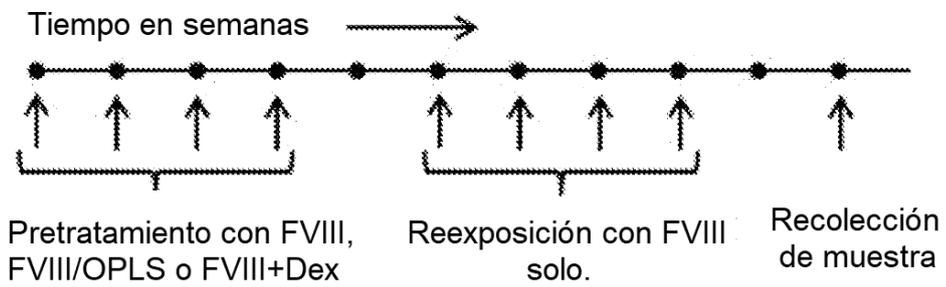
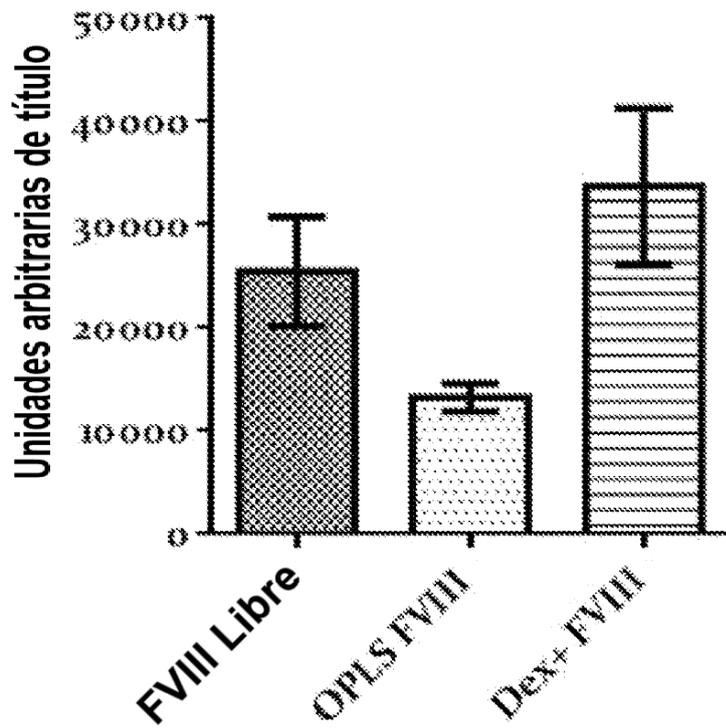


Figura 32

A

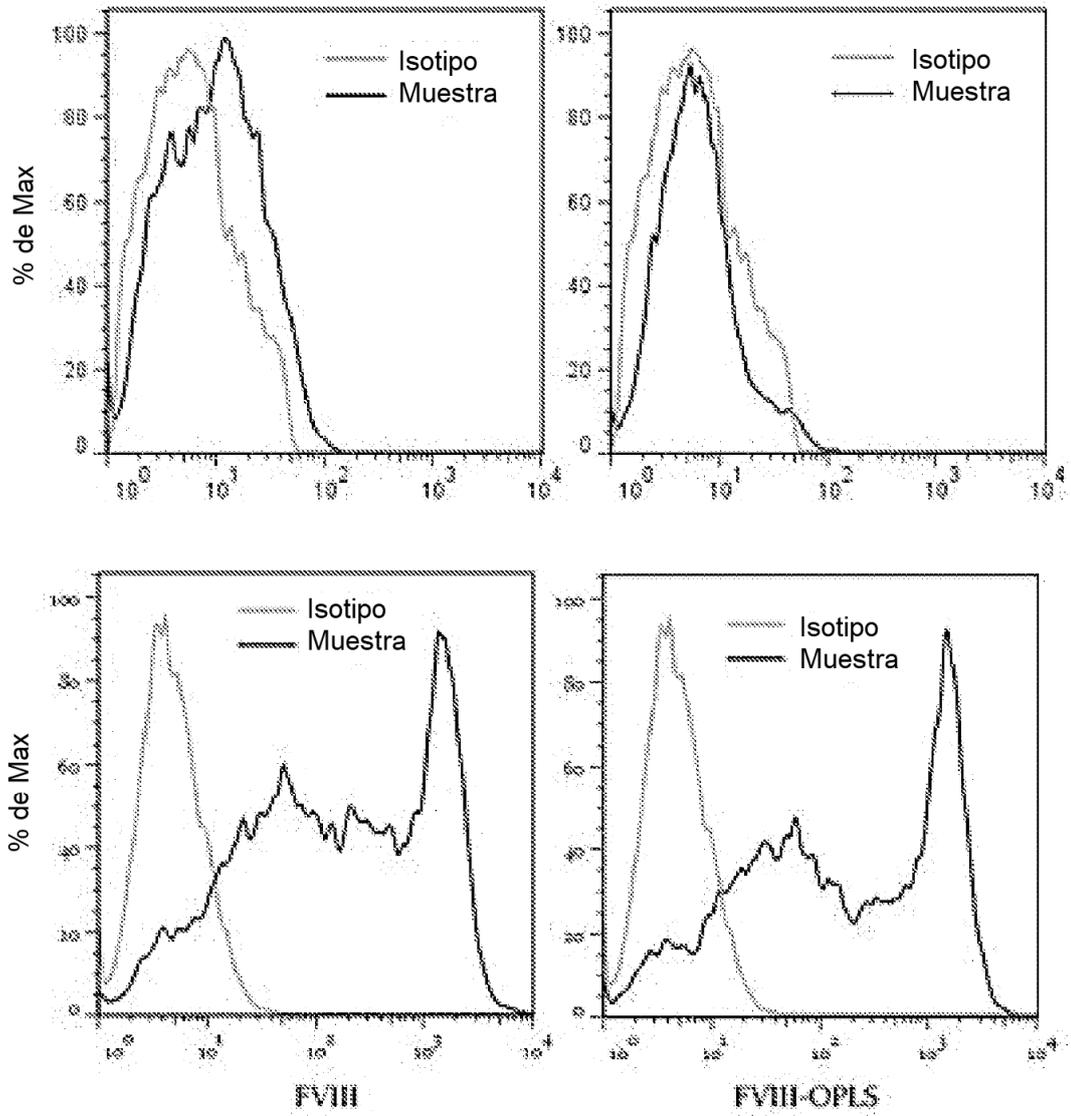


Figura 33A

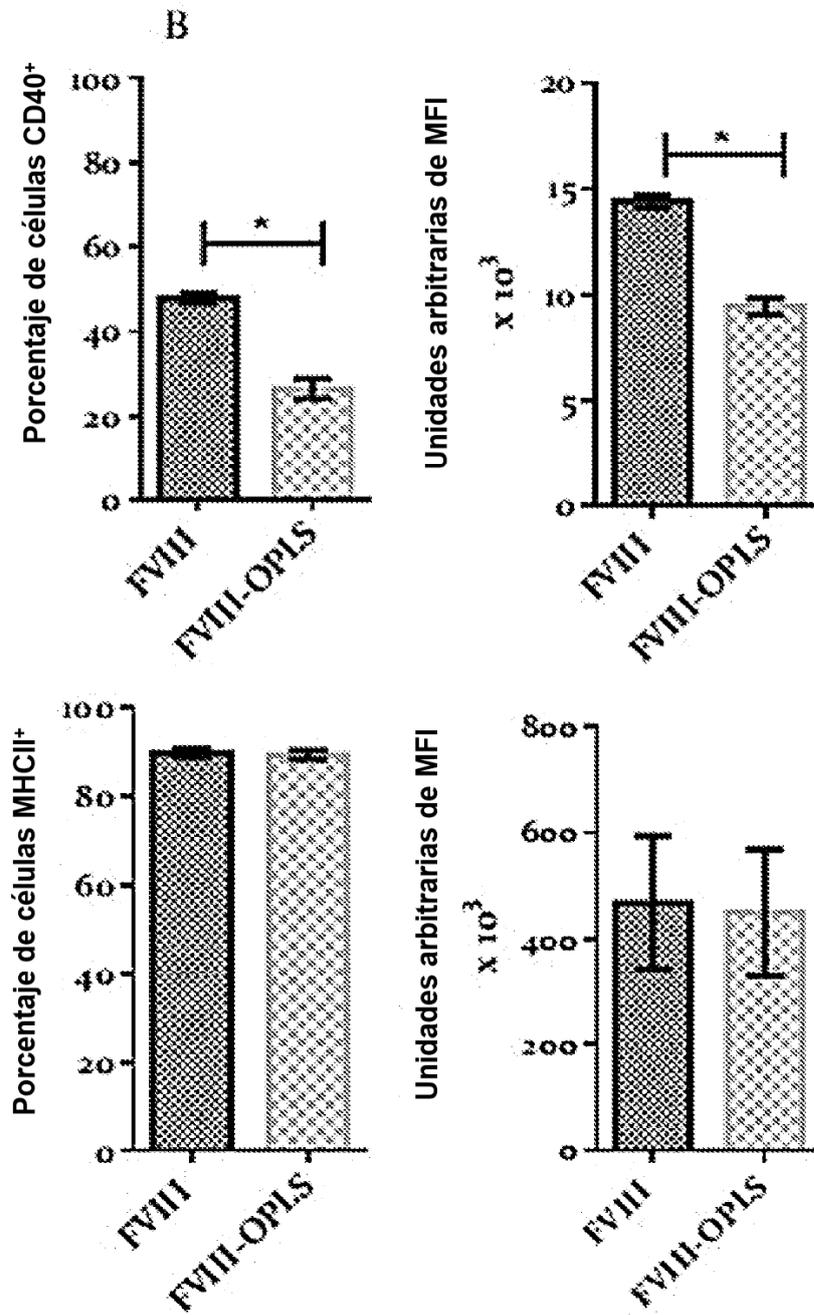


Figura 33B

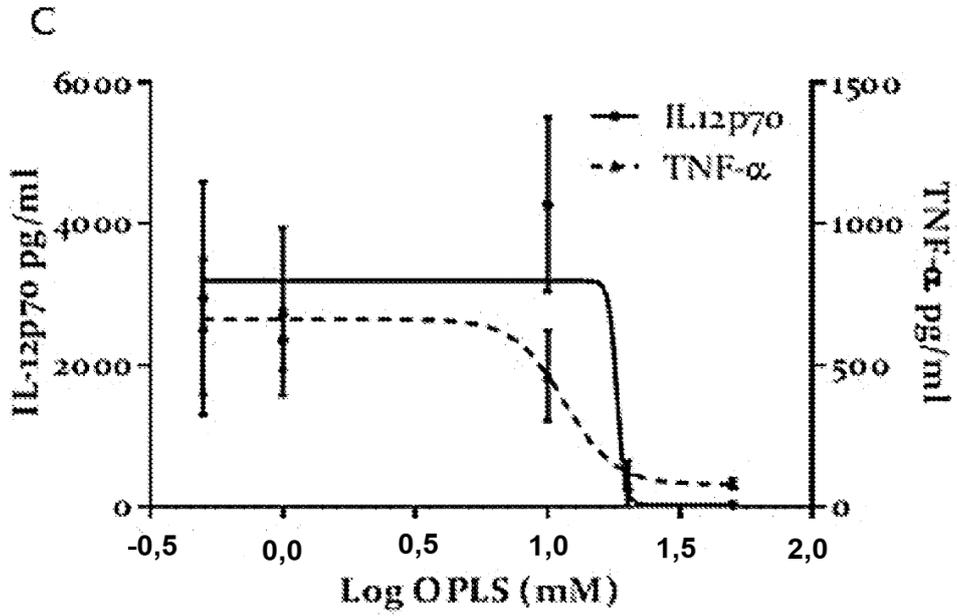


Figura 33C

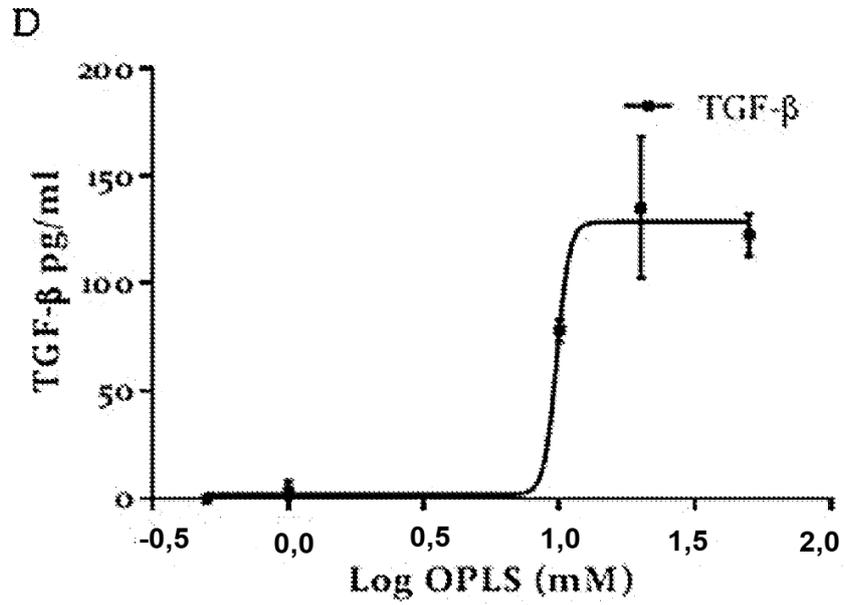


Figura 33D

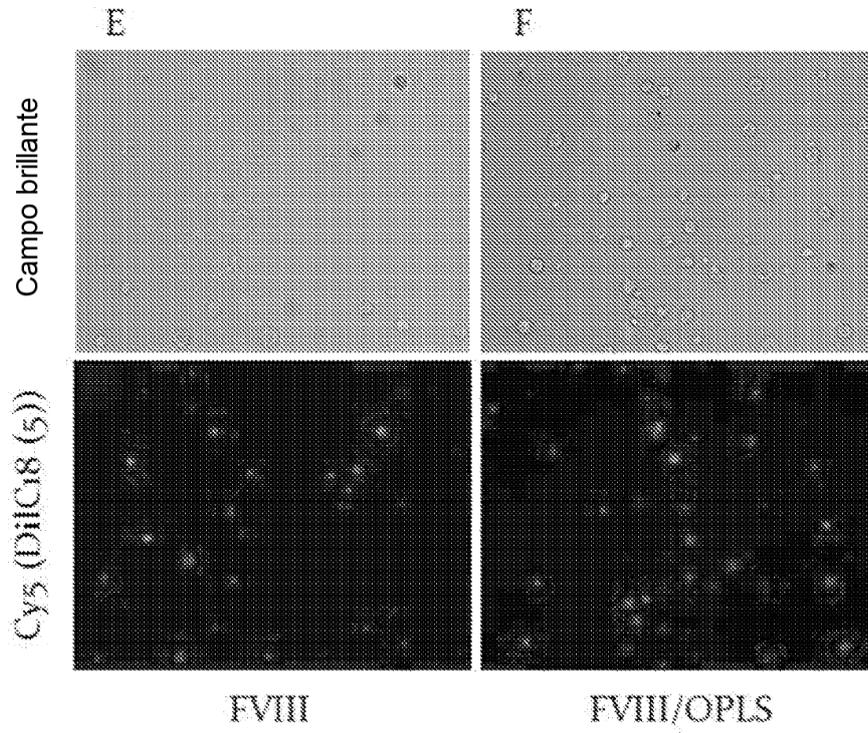


Figura 33E

Figura 33F

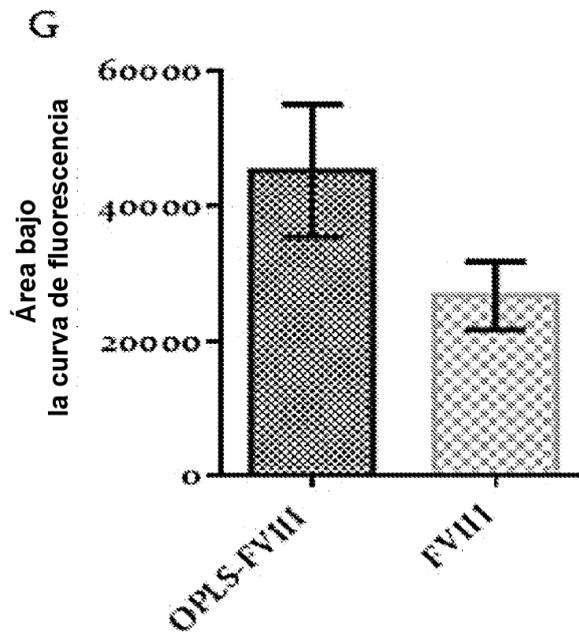


Figura 33F

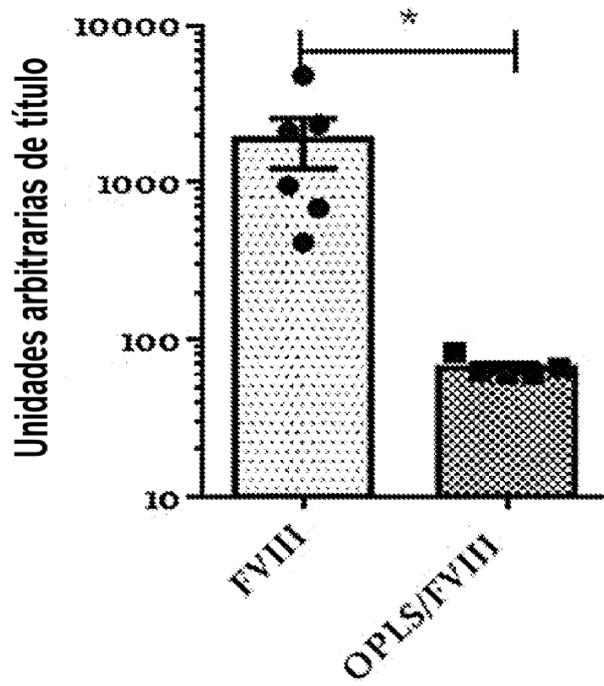


Figura 34

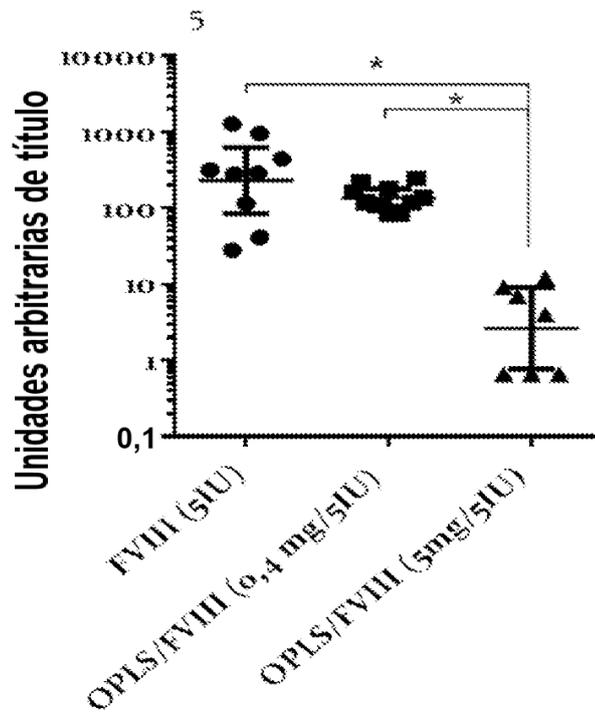


Figura 35