

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 897 707**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.12.2015 PCT/US2015/000340**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016 WO16105542**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2015 E 15873812 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.08.2021 EP 3237003**

54 Título: **Composiciones de nanopartículas y procedimientos para la inmunoterapia**

30 Prioridad:

24.12.2014 US 201462096725 P

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

02.03.2022

73 Titular/es:

**NEXIMMUNE, INC (100.0%)
9119 Gaither Road
Gaithersburg, MD 20877, US**

72 Inventor/es:

El inventor ha renunciado a ser mencionado

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 897 707 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de nanopartículas y procedimientos para la inmunoterapia

REFERENCIA A LAS SOLICITUDES PRIORITARIAS

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional U.S. nº 62/096.725 presentada el 24 de diciembre de 2014.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a composiciones de nanopartículas que presentan ligandos biológicos para modular la actividad de las células inmunitarias.

ANTECEDENTES

Una célula presentadora de antígenos (APC) es una célula que procesa y muestra péptidos antigénicos en complejos con proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en sus superficies. Las células efectoras, como las células T, reconocen estos complejos péptido-MHC (pMHC) a través de receptores de la superficie celular, tal como los receptores de células T (TCR).

Las células dendríticas (DCs) son un ejemplo de célula presentadora de antígeno que puede ser estimulada para presentar efectivamente el antígeno y apoyar la expansión de las células efectoras inmunes, activando así una respuesta citotóxica hacia un antígeno. En algunas inmunoterapias, las DC se recolectan de un paciente y se pulsan con un antígeno o se transfectan con un vector viral. Tras la transfusión al paciente, estas células activadas presentan el antígeno tumoral a los linfocitos efectores (por *ejemplo*, células T CD4⁺, células T CD8⁺ y células B). Cuando tiene éxito, esta terapia inicia una respuesta citotóxica contra las células que expresan antígenos (incluidos los antígenos tumorales).

El documento US 8,629,098 divulga micropartículas y nanopartículas poliméricas de PLGA como células artificiales presentadoras de antígeno.

Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de composiciones farmacéuticas estables que sean eficaces para la inmunoterapia, incluida la inmunoterapia específica de antígeno para el cáncer. Esta divulgación cumple estos y otros objetivos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona composiciones para inmunoterapia, que incluyen composiciones farmacéuticas estables para inducir células T específicas de antígeno en un paciente. Estas composiciones son útiles para el tratamiento de, por ejemplo, el cáncer y las enfermedades infecciosas. La composición comprende una célula presentadora de antígenos artificial (aAPC), que comprende una perla o partícula farmacéuticamente aceptable que tiene complejos presentadores de antígenos y señales coestimuladoras de células T en su superficie, para proporcionar a un paciente complejos moleculares que presentan uno o más antígenos (por ejemplo, antígeno(s) tumoral(es)) en el contexto adecuado para la activación de células T específicas de antígeno (por ejemplo, células T citotóxicas). La perla o las partículas están diseñadas para proporcionar ventajas farmacodinámicas, incluidas las propiedades circulatorias, la biodistribución, la cinética de degradación, así como la activación y/o expansión específica de antígenos de células T ingenuas y/o previamente activadas. Los parámetros físicos incluyen el tamaño, la carga superficial, el índice de polidispersidad, la composición del polímero, la química de conjugación del ligando, la densidad del ligando, la relación del ligando, entre otros. La invención proporciona aAPCs a nanoescala (que tienen un tamaño en el intervalo de 20 a 200 nm) que se distribuyen a los tejidos de destino, tales como los ganglios linfáticos, el bazo, y los sitios del tumor. La plataforma de nano-aAPC descrita en este documento puede ser ajustada para diversas aplicaciones de inmunoterapia. En algunas realizaciones, las aAPCs pueden contener de 5 a aproximadamente 1500 ligandos por partícula, incluyendo en algunas realizaciones, menos de aproximadamente 150 ligandos por partícula, o menos de aproximadamente 100 ligandos por partícula, tal como de aproximadamente 5 a aproximadamente 90 ligandos por partícula. En algunas realizaciones, las nano aAPCs tienen (en promedio) menos de aproximadamente 150 ligandos o menos de aproximadamente 100 ligandos conjugados a su superficie, evitando así las restricciones estéricas de una abundancia de ligandos en la superficie, sin pérdida de actividad y/o potencia.

En algunas realizaciones, la señal coestimuladora de células T es un anticuerpo anti-CD28 o una porción de unión a antígeno del mismo, que puede comprender secuencias de aminoácidos de cadena pesada humana, incluyendo secuencias seleccionadas de los isotipos IgG, IgD, IgA o IgM. En algunas realizaciones, las secuencias de inmunoglobulina incluyen secuencias constantes y variables de IgG humana. Las secuencias marco (FW) pueden modificarse para que contengan residuos importantes o deseados del marco murino para mantener la integridad del sitio o sitios de unión al antígeno. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) pueden basarse en una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo murino (por ejemplo, 9.3 mAb), u otra secuencia de unión a CD28, y

que puede unirse a un epítipo competidor con 9.3 mAb. En algunas realizaciones, la cadena pesada del anticuerpo es una variante de la línea germinal del IGHV4 humano (por ejemplo, IGHV4-59). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena ligera y la cadena ligera es una variante de un IGKV4-01 FW humano. El anticuerpo puede comprender una región constante, y la región constante es una región constante IgG4 humana o una variante de la misma en algunas realizaciones.

La molécula coestimuladora se conjuga con un soporte sólido con complejos moleculares presentadores de antígeno, para inducir células T específicas de antígeno. El complejo molecular presentador de antígeno puede incluir complejos MHC de clase I y/o de clase II, o porciones de los mismos que comprenden una hendidura de unión al antígeno. En algunas realizaciones, el complejo molecular comprende una o más secuencias de aminoácidos del HLA (por ejemplo, comprende el dominio extracelular del HLA o la porción presentadora de antígenos del mismo), que puede contener secuencias adicionales, como secuencias de inmunoglobulina, u otra secuencia multimerizante (por ejemplo, dimerizante) o estabilizadora. Las fusiones de HLA-Ig dimerizadas en algunas realizaciones proporcionan ventajas en estabilidad, afinidad de unión y/o activación de células T.

Se divulga un complejo molecular conjugado con perlas o partículas para la presentación de antígenos a las células T, en el que el complejo comprende una secuencia de aminoácidos que forma una hendidura de unión a antígenos de clase I o clase II, o una parte de la misma. Las secuencias de aminoácidos del complejo presentador de antígeno pueden incluir fusiones a secuencias heterólogas, para proporcionar estabilidad, afinidad y ventajas estéricas, por ejemplo. Las secuencias heterólogas pueden incluir secuencias de inmunoglobulina. El complejo molecular puede incluir secuencias de aminoácidos HLA (por ejemplo, HLA-A2) fusionadas con secuencias heterólogas, como secuencias de inmunoglobulina. Las secuencias de inmunoglobulina pueden comprender una secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada humana (por ejemplo, IGHV4), que puede incluir secuencias de región constante de inmunoglobulina (por ejemplo, que comprende la región bisagra) para proporcionar HLA dimérico, y puede comprender opcionalmente secuencias de región variable. Las secuencias de la región variable, si están presentes, pueden ser opcionalmente modificadas para reducir o eliminar la unión potencial del antígeno, y opcionalmente sin residuos de FW murino. El complejo de presentación de antígenos HLA puede estar fusionado directamente con la región bisagra de la Ig (por ejemplo, no incluye secuencias variables de cadena ligera o pesada). La secuencia de aminoácidos del HLA puede ser HLA-A*02:01 (número de acceso al IMGT HLA00005) o un derivado de la misma.

El ligando coestimulador de células T y los complejos de presentación de antígeno (así como otros ligandos divulgados en el presente documento, incluidos los ligandos de orientación) se conjugan con un soporte de partículas para la presentación de antígeno *ex vivo* o *in vivo* y la activación de células T específicas de antígeno. La partícula está formada por un núcleo de polímero PLGA, con polímeros PLGA-PEG y PLGA-metoxiPEG. Los grupos funcionales superficiales para los ligandos de acoplamiento se unen al extremo terminal de las cadenas de PEG que forman una vaina hidrofílica. Las partículas están diseñadas para proporcionar ventajas farmacodinámicas, incluyendo propiedades de circulación, biodistribución y cinética de degradación, así como una alta potencia para activar las células T específicas de antígeno. Los parámetros físicos incluyen el tamaño, la carga superficial, la composición del polímero, la química de conjugación del ligando y la densidad del ligando, entre otros. Las partículas tienen un núcleo de polímero PLGA, y una cubierta hidrofílica formada por la porción de PEG de los copolímeros, en la que una porción de los polímeros tiene una unión terminal de un ligando polipeptídico. La cubierta hidrofílica comprende algunas cadenas de PEG que son inertes con respecto a los grupos funcionales para la conjugación del ligando, como los polímeros PLGA-PEG-MeOH. En estas realizaciones, la química de las partículas permite un buen control de la densidad del ligando.

Las partículas son nanopartículas poliméricas de la química PLGA-PEG descrita en detalle en el presente documento y tienen un tamaño dentro del intervalo de 20 a 200 nm. En algunas realizaciones, la densidad del ligando está controlada, de manera que hay de 5 a aproximadamente 1500 ligandos por partícula (en promedio), y en algunas realizaciones menos de aproximadamente 150 ligandos por partícula o menos de aproximadamente 100 ligandos por partícula (por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 90 ligandos por partícula).

La composición farmacéutica comprende además un péptido antigénico para su presentación a las células T, y que está coformulado con la perla o partícula conjugada con el ligando. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica es estable y puede proporcionarse en forma liofilizada para su reconstitución antes de la administración o, alternativamente, en otro formato conveniente para la administración a los pacientes (por ejemplo, por administración parenteral).

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento son útiles para la inmunoterapia, por ejemplo, en procedimientos para inducir la formación de células T específicas de antígeno, mediante la administración de una cantidad eficaz de la composición a un paciente que la necesite. En particular, las plataformas de presentación de antígenos pueden ser útiles para tratar a pacientes con cáncer, enfermedades infecciosas o autoinmunes, o para proporcionar protección profiláctica a pacientes inmunodeprimidos. Las composiciones de nanopartículas pueden administrarse después de la inmunoterapia contra el cáncer, como la terapia de inhibidores de puntos de control y/o después de la inmunoterapia de células T adoptivas, y así proporcionar un ataque inmunológico mejorado y/o sostenido contra una variedad de cánceres.

Los detalles de la invención se exponen en la descripción y las reivindicaciones que se acompañan a continuación. Aunque en la práctica o en las pruebas de la presente invención pueden utilizarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen procedimientos y materiales ilustrativos. Otras características, objetos y ventajas de la invención se desprenden de la descripción y de las reivindicaciones. En la especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares también incluyen el plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por una persona con conocimientos normales en la técnica a la que pertenece esta invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 10 Las **FIGS. 1-3** muestran tres secuencias pesadas variables humanizadas para anti-CD28.
- Las **FIGS. 4-6** muestran tres secuencias ligeras variables humanizadas para el anti-CD28.
- La **FIG. 7** muestra una secuencia pesada constante modificada.
- La **FIG. 8** muestra una secuencia ligera κ constante.
- La **FIG. 9** muestra una región variable humanizada que no se une a la CD28 para construir una fusión HLA.
- 15 La **FIG. 10** muestra la secuencia de aminoácidos del HLA-IgG4HC humanizado.
- La **FIG. 11** muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera 3 (LC3, o Y κ 3).
- La **FIG. 12** muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada 1 (HC1).
- La **FIG. 13** muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada 2 (HC2).
- 20 Las **FIGS. 14-16** muestran los constructos de expresión para la expresión en la línea celular STABLEFAST-NSO.
- La **FIG. 17** muestra que el mAb humanizado anti-CD28 no es un superagonista.
- La **FIG. 18** muestra que los clones anti-CD28 humanizados tiñen específicamente el CD28 en una línea de células T humanas. La **FIG. 18(A)**: tinción con mAb CD8 murino antihumano (clon 9.3, isotipo IgG2a); La **FIG. 18(B)**: tinción con anti-CD28 humanizado (isotipo IgG4).
- 25 La **FIG. 19** muestra el diseño de proteínas de fusión MHC-Ig más pequeñas basadas en la fusión del complejo presentador de antígeno directamente con la región bisagra Fc.
- La **FIG. 20** muestra una comparación entre PLGA y PLGA-PEG-COOH nano-aAPC, con ligandos conjugados a través de aminas primarias disponibles. Con una relación de PEG-COOH : mPEG de 1:4, las perlas eran estables y activas.
- 30 La **FIG. 21** muestra que las nano-aAPC tiñen específicamente las células T con TCRs afines. Se muestra un ensayo bioanalítico basado en FACS para la especificidad de unión del TCR.
- La **FIG. 22** muestra que las partículas PLGA-PEG aAPC estimulan la proliferación de células T específicas de antígeno de forma dependiente de la dosis.
- La **FIG. 23** muestra que las aAPC basadas en PLGA-PEG son estables tras la liofilización.
- 35 La **FIG. 24** muestra un cultivo de Día 4 de células T 2C con cantidades crecientes de aAPC nano PLGA-PEG cargadas con SIY.
- La **FIG. 25** muestra grupos de proliferación de células T 1 día después de la estimulación con nano-aAPCs.
- La **FIG. 26** muestra la actividad de unión de los ligandos coestimuladores modificados (Gen 2.0).
- 40 La **FIG. 27** muestra que las nano-aAPCs basadas en la proteína bisagra Fc Kb-SIY tiñen específicamente las células T 2C diana afines.
- La **FIG. 28** muestra el nano-aAPC con conjugación de ligandos por tiol en un sitio específico. Las perlas contenían una relación 1:1 de polímeros PEG-COOH y mPEG (72B) o una relación 1:9 de PEG-mal:mPEG (77B). Ambos estaban estables y activos.
- 45 La **FIG. 29** muestra la expansión de células T 2C específicas de K^b (A) y de células T pmel específicas de Db-gp100 utilizando nano aAPCs que contienen constructos de dímeros de bisagra.

La **FIG. 30** muestra la expansión basada en nano aAPC de células T humanas específicas de CMV o MART-1. Los APC basados en Dynal se muestran a modo de comparación.

La **FIG. 31** ilustra formulaciones ejemplares de nanopartículas. (A) Conjugación de los ligandos a las partículas con la quimioterapia dirigida al sitio de maleimida; (B) caracterización de las partículas por dispersión dinámica de la luz (DLS); (C) carga y PDI del lote de NI-26.

La **FIG. 32** enumera las propiedades de lotes ejemplares de formulación de nanopartículas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se utilizan las siguientes abreviaturas en todo el documento: BLAST-Basic Local Alignment Search Tool, CDR-Región determinante de la complementariedad, C κ -Región constante de la cadena ligera kappa, Fc-Región cristalizante del fragmento del anticuerpo, Fw-Región del marco (de las regiones variables), HLA-Antígeno leucocitario humano, MHC-Complejo mayor de histocompatibilidad, V H -Pesado variable, V κ -Ligera kappa variable y V-Región variable de un anticuerpo, ya sea V H o V κ .

La presente invención proporciona composiciones para inmunoterapia, que incluyen composiciones farmacéuticas estables para inducir células T específicas de antígeno en un paciente. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden complejos de presentación de antígenos HLA diméricos. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden secuencias de inmunoglobulina humanizada o porciones de las mismas, que pueden emplearse como componentes de los ligandos en células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC), para proporcionar a un paciente complejos moleculares diméricos para la presentación de uno o más antígenos (por ejemplo, antígeno(s) tumoral(es)) y opcionalmente una o más señales coestimuladoras. Las plataformas de presentación de antígenos, como se describe con más detalle a continuación, pueden basarse en soportes sólidos artificiales, como soportes farmacéuticamente aceptables que incluyen perlas o partículas poliméricas.

En algunas realizaciones, la señal coestimuladora de células T es un anticuerpo anti-CD28 o una porción del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD28 comprende secuencias de al menos un isotipo de inmunoglobulina humana seleccionado entre IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA o IgM. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD28 puede ser un isotipo IgG, y puede contener secuencias de una o más secuencias marco de la línea germinal IgG. Por ejemplo, el anti-CD28 puede contener una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de IGHV4 humana, que puede estar modificada con entre uno y quince aminoácidos. Las modificaciones pueden comprender residuos de marco murino para apoyar la integridad del sitio o sitios de unión al antígeno.

La región determinante de la complementariedad (CDR) en algunas realizaciones se basa en una secuencia de aminoácidos de anticuerpos murinos, que puede tener opcionalmente de uno a diez, por ejemplo de uno a cinco, modificaciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, uno, dos, tres o más CDRs se basan en el mAb 9.3 de ratón (Tan et al. J. Exp. Med. 1993 177:165), que es de acceso público. En las **FIGURAS 1-6** se muestran ejemplos de CDR. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene el conjunto completo de la cadena pesada y/o el conjunto completo de las CDR de la cadena ligera de 9,3 mAb. Por ejemplo, en algunas realizaciones la región variable de la cadena pesada contiene una, dos o tres de las siguientes CDR, que opcionalmente pueden ser modificadas cada una por una, dos o tres sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos: CDR1 (DYGVH), CDR2 (VIWAGGGTNYNSALMS) y CDR3 (DKGYSYYMDY). En algunas realizaciones, la región variable de la cadena ligera contiene una, dos o tres de las siguientes CDR, cada una de las cuales puede ser modificada por una, dos o tres sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos: CDR1 (RASESVEYYVTSLMQ), CDR2 (AASNVES) y CDR3 (QQSRKVPYT).

En algunas realizaciones, el ligando anti-CD28 se une al mismo epítipo o al que se solapa con el 9.3 mAb, o se une al mismo epítipo o al que se solapa con un anticuerpo que tiene CDR1, CDR2 y CDR3 del 9.3 mAb. Los anticuerpos con el mismo epítipo o con epítipos superpuestos pueden seleccionarse mediante cualquier técnica adecuada, incluidos los inmunoensayos competitivos, utilizando, por ejemplo, la Resonancia de Plasmón de Superficie (Biacore).

En diversas realizaciones pueden emplearse secuencias CDR alternativas, regiones variables o ligandos de unión a CD28. Los ligandos alternativos, los epítipos de CD28 y los anticuerpos anti-CD28 se describen en Patente U.S. 7.612.170, La patente U.S. 6.987.171y Patente U.S. 6.887.466 por ejemplo.

En algunas realizaciones, la cadena pesada del anticuerpo comprende una variante de un marco de línea germinal (FW) humana IGHV4-59, que se modifica para incluir de 5 a 15 residuos FW murinos. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende secuencias de aminoácidos de la cadena ligera, y las secuencias de la cadena ligera pueden ser una variante de las secuencias IGKV4-01 FW humanas, y que pueden ser modificadas para incluir de 3 a 15 residuos FW murinos.

La secuencia de cadena pesada humana anti-CD28 puede modificarse, por ejemplo, para que comprenda uno o más (por ejemplo, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, o todos) residuos Fw murinos en las posiciones 1, 3, 6, 37, 48, 67, 71, 73, 76, 78, 82, 82a y 82c (según la numeración de Kabat). Los residuos Fw murinos en estas posiciones pueden ser como en el 9.3 mAb. La cadena ligera puede ser modificada para comprender uno o más (por ejemplo, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, o todos) residuos Fw murinos en las posiciones 3, 4, 49, 70, 85, 87 y 80. Algunos residuos

del Fw murino pueden favorecer la integridad de los sitios de unión al antígeno. El anticuerpo humanizado anti-CD28 mantiene la afinidad por CD28 y la actividad coestimuladora de células T de 9.3 mAb, y es al menos 40 %, 50 %, 75 %, 80 %, 90 %, y en algunas realizaciones 100 % o más eficaz para la unión de CD28 y la activación de células T que 9.3 mAb. En diversas realizaciones, el ligando anti-CD28 no es un súper agonista. En algunas realizaciones, el ligando anti-CD28 se une al mismo epítipo o al que se solapa con el 9.3 mAb.

El anticuerpo puede comprender una región constante y la región constante puede ser cualquier isotipo. En algunas realizaciones, la región constante del anticuerpo es una IgG4 humana o una variante de la misma. En algunas realizaciones, la región constante comprende una o más mutaciones estabilizadoras de bisagra, que pueden introducirse en la cadena CH (por ejemplo, S241, que puede sustituirse por P). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante y la región constante comprende una o más mutaciones adecuadas para acoplar químicamente el anticuerpo a un soporte sólido. La una o más mutaciones adecuadas para el acoplamiento pueden crear un grupo funcional de cadena lateral de aminoácido (por ejemplo, tiol, amina o hidroxilo), como una cisteína no apareada (por ejemplo, en S473). Otros cambios en la región constante incluyen aquellas modificaciones para reducir la unión del receptor Fc gamma. Por ejemplo, la cadena CH puede ser modificada en L248, por ejemplo, L248E.

En algunas realizaciones, el ligando coestimulador se minimiza de manera que el ligando es más adecuado para la fijación funcional a las superficies de las nanopartículas. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo, como $F(ab')_2$ o Fab, o es un anticuerpo de cadena simple, u otro fragmento de anticuerpo de unión a antígeno. Por ejemplo, el fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento variable de cadena única del mAb humanizado descrito en el presente documento u otro anti-CD28.

En algunas realizaciones, la molécula coestimuladora es un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende o consiste esencialmente en los bucles de unión a antígeno formados por las cadenas VH y VL de un mAb antiCD28, como un anticuerpo descrito en el presente documento. Los constructos de anticuerpos scFv pueden comprender una o varias (2, 3, 4 o 5) cadenas de región hipervariable VH y VL (la porción de cada cadena que forma conjuntamente los bolsillos de unión al epítipo antigénico en 3-D) unidas entre sí en configuraciones de cabeza-cabeza o cabeza-cola mediante enlazadores peptídicos cortos. Estos constructos pueden producirse cómodamente por una vía completamente sintética debido a su menor tamaño. Además, los scFv pueden presentar un menor potencial de inmunogenicidad.

En otras realizaciones, el ligando coestimulador es un constructo biespecífico que comprende una o más moléculas HLA unidas a un scFv de un ligando de molécula coestimuladora o un ligando inhibidor. El complejo presentador de antígenos y el ligando coestimulador o inhibidor pueden conjugarse a través de un anclaje peptídico que permite unir covalentemente la construcción biespecífica a la superficie de una nanopartícula. En algunas realizaciones, tales constructos producen la misma actividad que las nanopartículas que contienen constructos más grandes de HLA y ligandos coestimuladores o inhibidores, cada uno de ellos unido a la superficie de la NP de forma independiente, lo que proporciona ventajas de fabricación.

En algunas realizaciones, se utilizan otros formatos de unión al ligando para producir el ligando coestimulador, incluyendo péptidos, aptámeros y AdNectinas. Los diversos formatos de unión a la diana incluyen un anticuerpo de dominio único, un anticuerpo recombinante de cadena pesada (VHH), un anticuerpo de cadena única (scFv), un anticuerpo solo de cadena pesada de tiburón (VNAR), una microproteína (proteína de nudo de cisteína, knottin), un DARPin, una tetranectina, un aficuerpo un transcuerpo, una anticalina, una afilina, un microcuerpo, un aptámero peptídico, un filómero, un estradocuerpo, un maxicuerpo, un evicuerpo, un finómero, una proteína de repetición de armadillo, un dominio de Kunitz, un avímero, un atrímero, un procuerpo, un inmunocuerpo, un triomab, un troicuerpo, un pepcuerpo, un UniCuerpo, un DuoCuerpo, un Fv, un Fab, un Fab', un $F(ab')_2$, una molécula mimética de péptidos o una molécula sintética, o como se describe en los números de patente US o en la publicación de patentes Nos US 7.417.130, US 2004/132094, US 5.831.012, US 2004/023334, US 7.250.297, US 6.818.418, US 2004/209243, US 7.838.629, US 7.186.524, US 6.004.746, US 5.475.096, US 2004/146938, US 2004/157209, US 6.994.982, US 6.794.144, US 2010/239633, US 7.803.907, US 2010/119446 y/o US 7.166.697. Véase también, Storz MABs. 2011 Mayo-Jun; 3(3): 310-317.

La molécula coestimuladora se conjuga con un soporte sólido con complejos moleculares presentadores de antígeno, para inducir células T específicas de antígeno. El complejo molecular presentador de antígeno puede incluir complejos MHC de clase I y/o de clase II, o porciones de los mismos que comprenden una hendidura de unión al antígeno. En algunas realizaciones, el complejo molecular comprende una o dos secuencias de aminoácidos HLA, que pueden contener secuencias heterólogas adicionales, tales como secuencias de inmunoglobulina. Las secuencias heterólogas alternativas incluyen secuencias de aminoácidos dimerizantes como c-fos y c-jun. Las fusiones HLA en algunas realizaciones proporcionan ventajas adicionales en cuanto a estabilidad, afinidad de unión y/o activación de células T.

En diversas realizaciones, el complejo presentador de antígeno es un complejo molecular MHC clase I o un complejo molecular MHC clase II, o alternativamente CD1d. El complejo molecular MHC de clase I puede comprender al menos dos proteínas de fusión. Una primera proteína de fusión comprende una primera cadena α del CMH de clase I y una primera cadena pesada de inmunoglobulina y una segunda proteína de fusión comprende una segunda cadena α del CMH de clase I y una segunda cadena pesada de inmunoglobulina. La primera y la segunda cadena pesada de inmunoglobulina se asocian para formar el complejo molecular MHC de clase I. El complejo molecular MHC clase I

comprende una primera hendidura de unión al péptido MHC clase I y una segunda hendidura de unión al péptido MHC clase I. El complejo molecular del MHC de clase II puede comprender al menos cuatro proteínas de fusión. Dos primeras proteínas de fusión comprenden (i) una cadena pesada de inmunoglobulina y (ii) un dominio extracelular de una cadena MHC clase II β . Dos segundas proteínas de fusión comprenden (i) una cadena ligera de inmunoglobulina y (ii) un dominio extracelular de una cadena MHC clase II α . Las dos primeras y las dos segundas proteínas de fusión se asocian para formar el complejo molecular MHC de clase II. El dominio extracelular de la cadena MHC clase II β de cada primera proteína de fusión y el dominio extracelular de la cadena MHC clase II α de cada segunda proteína de fusión forman una hendidura de unión al péptido MHC clase II. Los péptidos antigénicos se unen a las hendiduras de unión a péptidos. En diversas realizaciones, la secuencia de inmunoglobulina es una secuencia parcial de cadena pesada que comprende la región bisagra para apoyar la dimerización.

En algunas realizaciones, el complejo presentador de antígeno es un monómero HLA sintético o recombinante (por ejemplo, la cadena alfa de clase I con $\beta 2$ microglobulina) diseñado para contener una cisteína no apareada, o utilizando una cisteína no apareada de origen natural, para su conjugación con las nanopartículas. Además, la señal coestimuladora (u otro ligando basado en anticuerpos) puede ser un Fab o un scFv. En tales realizaciones, las dos señales pueden combinarse en una única construcción multifuncional que comprende una molécula HLA unida a un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno (por ejemplo, scFv) que se une a un receptor deseado.

Se divulga un complejo molecular conjugado con perlas o partículas para la presentación de antígenos a las células T, donde el complejo comprende una secuencia de inmunoglobulina humanizada o una porción de la misma fusionada a una secuencia de presentación de antígenos, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos HLA. La secuencia de inmunoglobulina puede ser una secuencia de cadena pesada humana (por ejemplo, el marcoIGHV4). La región variable no comprende una actividad de unión a antígenos a CD28, o a otra proteína humana. La secuencia de aminoácidos del HLA puede ser HLA-A*02:01 (número de acceso al IMGT HLA00005) o un derivado o fragmento del mismo, como un derivado que tenga de 1 a 10, o de 1 a 5, sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos. La secuencia de inmunoglobulina humanizada puede comprender además una secuencia de aminoácidos de enlace entre las secuencias de HLA e inmunoglobulina. Preferiblemente, el enlazador carece de inmunogenicidad. El complejo molecular puede comprender además el péptido $\beta 2$ microglobulina.

Las secuencias de fusión de inmunoglobulina pueden ser de isotipo IgG, IgD, IgA o IgM, y pueden derivarse de cualquier marco de línea germinal humana. El marco de la línea germinal incluye IGHV4 (por ejemplo, IGHV4-59), que puede o no contener uno o más de los residuos de marco murino descritos con respecto al anti-CD28. La cadena pesada del anticuerpo anti-CD28 descrito anteriormente (con o sin residuos de marco murino) puede fusionarse con HLA de acuerdo con este aspecto, y en tales realizaciones, la región variable se modifica para reducir o eliminar la unión de CD28.

El constructo de fusión HLA puede no contener secuencias de cadena variable. Por ejemplo, el HLA o el complejo de presentación de antígeno puede fusionarse con una secuencia de región constante de Ig por encima de la región bisagra para proporcionar un HLA dimérico. Por ejemplo, un HLA o una porción de presentación de antígeno del mismo puede conjugarse con una porción CH1 de cada cadena pesada de IgG. Todas las moléculas de IgG están formadas por dos cadenas pesadas idénticas (regiones constante y variable) unidas por enlaces disulfuro en la región bisagra (superior e inferior). Por ejemplo, en algunas realizaciones, una molécula HLA o un complejo de presentación de antígenos se fusiona con la CH1 (extremo N-terminal de la cadena IgH por encima de la región bisagra), creando así una proteína de fusión dimérica que es más pequeña debido a la falta de cualquier secuencia de cadena ligera VH y VL. Así, estos constructos incluirían dominios CH2 y CH3. Este tipo de constructos puede proporcionar ventajas de fabricación, así como mostrar un menor potencial de inmunogenicidad. En algunas realizaciones, tales constructos también muestran una cooperatividad de unión suficiente para una activación eficiente de las células T, a pesar de la menor distancia de la región bisagra.

La química de las partículas permite ajustar con precisión la densidad del ligando. Generalmente, las nano aAPCs tienen de 5 a aproximadamente 1500 ligandos conjugados en su superficie por término medio. En algunas realizaciones, las partículas tienen menos de aproximadamente 500 ligandos por partícula, o menos de aproximadamente 400 ligandos por partícula, o menos de aproximadamente 300 ligandos por partícula, o menos de aproximadamente 200 ligandos por partícula. En algunas realizaciones, las nanopartículas poliméricas tienen menos de aproximadamente 150 ligandos por partícula, o menos de aproximadamente 100 ligandos por partícula. Por ejemplo, las partículas pueden tener entre 5 y 90 ligandos por partícula. En diversas realizaciones, las nanopartículas comprenden menos de aproximadamente 90 ligandos conjugados por partícula, o menos de aproximadamente 80, o menos de aproximadamente 70, o menos de aproximadamente 60, o menos de aproximadamente 50, o menos de aproximadamente 40, o menos de aproximadamente 30, o menos de aproximadamente 20 ligandos conjugados por partícula. En algunas realizaciones, la partícula contiene de 10 a aproximadamente 80 ligandos conjugados en su superficie, o de 10 a aproximadamente 70, o de 10 a aproximadamente 50 ligandos conjugados por partícula.

En todavía otras realizaciones, los complejos de presentación de antígenos (por ejemplo, secuencias HLA) no contienen socios de fusión de Ig, y son monoméricos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el extremo C-terminal del complejo presentador de antígeno o de la molécula HLA (por ejemplo, HLA-A2, etc.) contiene una secuencia de anclaje peptídica adecuada para la unión dirigida a un grupo funcional (por ejemplo, una fracción de maleimida) en un sustrato sólido/semisólido como una nanopartícula sintética (por ejemplo, que contenga polímeros en bloque PLGA-

PEG-maleimida). La secuencia del anclaje puede contener cualquier secuencia adecuada, que puede estar compuesta predominantemente por residuos hidrófilos como Gly, Ser, Ala y Thr, como dos, tres, cuatro o cinco repeticiones de GGGSG o AAAGG, con un residuo de cisteína incorporado en algún lugar dentro del anclaje de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 (o de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 aminoácidos). El residuo de cisteína debe incorporarse en un lugar en el que se prevé que no se formen enlaces disulfuro intramoleculares.

La fusión HLA-Ig u otro constructo HLA comprende además un péptido antigénico unido al HLA para su presentación a las células T. El péptido antigénico puede comprender una porción antigénica de uno o más de la tirosinasa, hTERT, MAGE-1, MAGE-3, gp-100, NY-ESO-1, Melan A/Mart-1, HPV 16-E7, gp75/marrón, BAGE, y S-100 y/o cualquiera de los péptidos antigénicos descritos en WO 2004/006951 para su presentación por complejos de clase I o de clase II.

Otras señales que pueden ser proporcionadas con el complejo presentador de antígeno incluyen: CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), B7-H3, 4-1BBL, CD27, CD30, CD134 (OX-40L), B7h (B7RP-1), CD40, LIGHT, (o fusiones de Ig, opcionalmente humanizadas como se describe en el presente documento, de dichas moléculas o porciones activas de las mismas), anticuerpos que se unen específicamente a HVEM, anticuerpos que se unen específicamente a CD40L, anticuerpos que se unen específicamente a OX40, anticuerpos que se unen específicamente a Fas, anticuerpos que se unen específicamente a PD1, anticuerpos que se unen específicamente a GITR y anticuerpos que se unen específicamente a 4-1BB. Cuando la señal coestimuladora es un anticuerpo contra un ligando natural, pueden emplearse las técnicas utilizadas en el presente documento para humanizar y/o minimizar el tamaño del ligando del anticuerpo (por ejemplo, scFv y constructos biespecíficos), y diseñar el anticuerpo para su conjugación con las partículas.

Las moléculas de adhesión útiles para las plataformas de presentación de antígenos de la invención pueden mediar la adhesión de la plataforma a una célula T o a un precursor de células T. Las moléculas de adhesión útiles en la presente invención incluyen, por ejemplo, ICAM-1 y LFA-3.

Los factores de crecimiento de las células T afectan a la proliferación y/o diferenciación de las células T. Algunos ejemplos de factores de crecimiento de células T son las citoquinas (por ejemplo, interleucinas, interferones) y los superantígenos. Entre las citoquinas particularmente útiles se encuentran la IL-2, la IL-4, la IL-7, la IL-10, la IL-12, la IL-15 y el interferón gamma. Los factores de crecimiento de las células T pueden estar encapsulados en las perlas o partículas o conjugados químicamente o adsorbidos a la superficie. Así, en algunas realizaciones, las nanopartículas comprenden además un compuesto terapéutico o proteína/péptido atrapado en el núcleo hidrófobo de la partícula (por ejemplo, un agente quimioterapéutico, una citoquina o interleucina como la IL-2, una quimiocina como la CCL9 que atrae a las células T, y/o una molécula inhibidora del punto de control como el anticuerpo anti-PDI o el péptido anti-PDI). En algunas realizaciones, este tipo de aAPC se construye para dirigirse a células específicas para su estimulación o inhibición, así como para su reprogramación. En algunas realizaciones, los compuestos atrapados son liberados por la degradación de la matriz de la partícula. Este tipo de aAPC podría hacer que las terapias combinadas fueran más tolerables y eficaces al limitar la actividad no deseada debida a las interacciones fuera del objetivo. En algunas realizaciones, las aAPCs de nanopartículas no encapsulan compuestos farmacológicos, como citoquinas y fármacos de moléculas pequeñas.

Los antígenos presentados de acuerdo con aspectos de la invención incluyen antígenos asociados a tumores. Los antígenos asociados a los tumores incluyen antígenos tumorales únicos expresados exclusivamente por el tumor del que derivan, antígenos tumorales compartidos que se expresan en muchos tumores pero no en los tejidos adultos normales (antígenos oncofetales, antígenos de cáncer/testículo) y antígenos específicos de los tejidos expresados también por el tejido normal del que surgió el tumor. Los antígenos asociados a tumores pueden ser, por ejemplo, antígenos embrionarios, antígenos con modificaciones postraduccionales anormales, antígenos de diferenciación, productos de oncogenes o supresores tumorales mutados, proteínas de fusión o proteínas oncovirales. Se conoce una variedad de antígenos asociados a tumores en la técnica, y muchos de ellos están disponibles públicamente. Los antígenos oncofetales y embrionarios incluyen el antígeno carcinoembrionario y la alfafetoproteína (normalmente sólo se expresan en gran medida en los embriones en desarrollo, pero con frecuencia se expresan en gran medida en los tumores de hígado y colon, respectivamente), la fosfatasa alcalina placentaria sialil-Lewis X (expresada en el adenocarcinoma), el CA-125 y el CA-19 (expresados en los tumores gastrointestinales, hepáticos y ginecológicos), TAG-72 (expresado en los tumores colorrectales), glicoproteína epitelial 2 (expresada en muchos carcinomas), antígeno oncofetal pancreático, 5T4 (expresado en el carcinoma gástrico), receptor de fetoproteína alfa (expresado en múltiples tipos de tumores, en particular los mamarios) y M2A (expresado en la neoplasia de células germinales).

En algunas realizaciones, al menos un antígeno es un antígeno Cáncer/Testículo (CT), que puede incluir NY-ESO-1, MAGE-A, B y C, CTAG-1, CTAG-45, GAGE y SSX, que normalmente se expresan en las células germinales del testículo y no en los tejidos somáticos adultos normales. Sin embargo, se ha demostrado que numerosos tipos de células cancerosas expresan los antígenos del TC, como el melanoma, la mama, el hígado, el pulmón, el ovario y el linfoma de Hodgkin.

Los antígenos de diferenciación asociados al tumor incluyen la tirosinasa (expresada en el melanoma) y determinadas inmunoglobulinas de superficie (expresadas en los linfomas).

Los productos génicos oncogénicos o supresores de tumores mutados incluyen Ras y p53, ambos expresados en muchos tipos de tumores, Her-2/neu (expresado en cánceres de mama y ginecológicos), EGF-R, receptor de

estrógeno, receptor de progesterona, producto génico del retinoblastoma, myc (asociado con el cáncer de pulmón), ras, p53 no mutante asociado con tumores de mama, MAGE-1 y MAGE-3 (asociado con melanoma, pulmón y otros cánceres).

Otros antígenos tumorales incluyen proteínas de fusión como BCR-ABL, que se expresa en la leucemia mieloide cromática, y proteínas oncovirales como el VPH tipo 16, E6 y E7, que se encuentran en el carcinoma cervical. Los antígenos tumorales específicos de tejido incluyen la melanotransferrina y la MUC1 (expresadas en los cánceres de páncreas y de mama); el CD 10 (anteriormente conocido como antígeno de la leucemia linfoblástica aguda común o CALLA) o la inmunoglobulina de superficie (expresada en las leucemias y linfomas de células B); la cadena α del receptor de la IL-2, el receptor de células T, el CD45R, el CD4+/CD8+ (expresados en las leucemias y linfomas de células T); antígeno específico de la próstata y fosfatasa ácida prostática (expresados en el carcinoma de próstata); gp100, MelanA/Mart-1, tirosinasa, gp75/marrón, BAGE y S-100 (expresados en el melanoma); citoqueratinas (expresadas en varios carcinomas); y CD19, CD20 y CD37 (expresados en el linfoma).

En algunas realizaciones, los péptidos antigénicos incluyen MART-1, gp100, NY-ESO-1 y MAGE-A3 que son presentados por los complejos de presentación de antígenos HLA descritos en el presente documento, como el complejo de fusión HLA-Ig descrito en el presente documento.

En algunas realizaciones, la aAPC presenta uno o más péptidos antigénicos basados en mutaciones impulsoras de tumores, o neoantígenos determinados a partir de la evaluación personalizada de un tumor del paciente.

En otras realizaciones, la composición comprende un cóctel de aAPCs que contienen una pluralidad de antígenos para el tipo de tumor, tales como al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 antígenos (por ejemplo, de 2 a 10 o de 3-8 antígenos). Por lo general, cada aAPC presenta un único antígeno.

En algunas realizaciones, el antígeno es un autoantígeno, que es el propio "antígeno propio" de un organismo al que el organismo produce una respuesta inmunitaria. Los autoantígenos están implicados en enfermedades autoinmunes como el síndrome de Goodpasture, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Graves, la miastenia gravis, el lupus eritematoso sistémico, la diabetes mellitis dependiente de la insulina, la artritis reumatoide, el pénfigo vulgar, la enfermedad de Addison, la dermatitis herpetiforme, la enfermedad celíaca y la tiroiditis de Hashimoto. Por ejemplo, los autoantígenos relacionados con la diabetes incluyen la insulina, la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) y otros autoantígenos de las células de los islotes, por ejemplo, la proteína tirosina fosfatasa ICA 512/IA-2, ICA12, ICA69, preproinsulina o un fragmento inmunológicamente activo de la misma (por ejemplo, cadena B de insulina, cadena A, péptido C o un fragmento inmunológicamente activo del mismo), IGRP, HSP60, carboxipeptidasa H, periferrina, gangliósidos (por ejemplo, GM1-2, GM3) o fragmentos inmunológicamente activos de los mismos.

En algunas realizaciones, los antígenos son de agentes infecciosos, como componentes de protozoos, bacterias, hongos (tanto unicelulares como multicelulares), virus, priones, parásitos intracelulares, helmintos y otros agentes infecciosos que pueden inducir una respuesta inmunitaria.

Los antígenos, incluidos los péptidos antigénicos, pueden unirse a una hendidura de unión de antígenos de un complejo presentador de antígenos de forma activa o pasiva, como se describe en Patente U.S. 6.268.411. Opcionalmente, un péptido antigénico puede estar unido covalentemente a una hendidura de unión peptídica.

Si se desea, se puede utilizar un anclaje peptídico para unir un péptido antigénico a una hendidura de unión peptídica. Por ejemplo, los análisis cristalográficos de múltiples moléculas del MHC de clase I indican que el extremo amino de β 2M está muy cerca, aproximadamente a 20,5 Angstroms de distancia, del extremo carboxilo de un péptido antigénico residente en la hendidura de unión al péptido del MHC. Así, utilizando una secuencia de enlace relativamente corta, de aproximadamente 13 aminoácidos de longitud, se puede atar un péptido al extremo amino de β 2M. Si la secuencia es adecuada, ese péptido se unirá al surco de unión del MHC (véase Patente U.S. 6.268.411).

En algunas realizaciones, las aAPCs tienen propiedades físicas que les permiten expandirse y activar células T específicas de antígeno (incluyendo células ingenuas), por ejemplo, para producir células T citotóxicas e idealmente células T de memoria de larga vida. Las nano-aAPC según la presente divulgación se diseñan basándose en aspectos como el tamaño de la partícula, la afinidad del ligando, la duración de la unión del ligando, las densidades y/o los grupos de ligandos de unión, el tamaño y la orientación de los ligandos, y las propiedades de la superficie de la partícula, entre otras cosas. Las células presentadoras de antígenos artificiales (aAPCs) han sido consideradas convencionalmente en el contexto de la sinapsis inmunológica, en la que se considera que el TCR y la agrupación de co-signos juegan un papel importante en la activación, particularmente para las células T ingenuas. Así, mientras que las aAPCs se han creado en un intento de imitar estas interacciones mediante el uso de partículas de tamaño celular y/o matrices diseñadas para proporcionar "balsas" o grupos de ligandos, las presentes aAPCs a nanoescala imitan el sistema biológico a través de partículas de tamaño nanométrico, teniendo en varias realizaciones el tamaño y la química de las partículas, los ligandos de células T, la orientación de los ligandos, las densidades de los ligandos y las relaciones de los ligandos.

El complejo presentador de antígeno y la señal coestimuladora se conjugan con partículas de PLGA-PEG que tienen grupos funcionales superficiales en el extremo terminal del copolímero de PEG (por ejemplo, el extremo que mira hacia fuera, hacia la superficie de la partícula), como las partículas de PLGA-PEG-maleimida, que proporcionan grupos

funcionales para el acoplamiento químico en la superficie exterior hidrofílica. En algunas realizaciones, las aAPCs persisten en la circulación sanguínea periférica el tiempo suficiente para permitir su distribución a los tejidos diana, incluyendo el tráfico a los ganglios linfáticos a través del intercambio sangre/linfa. La composición de la cubierta también puede influir en la biodistribución. Así, las partículas tienen una cubierta hidrofílica, que está formada por la porción de PEG del copolímero. En diversas realizaciones, la carga de las partículas es ligeramente negativa, por ejemplo, debido a la combinación de los grupos COOH en el PLGA así como por la carga aportada por los ligandos de focalización unidos a la superficie de la partícula. En algunas realizaciones, las partículas (con o sin ligando conjugado) tienen una carga superficial de aproximadamente 0 a aproximadamente -20 mV, o en algunas realizaciones de -5 a -15 mV, o de aproximadamente -5 a aproximadamente -10 mV. En algunas realizaciones, el tamaño y las características superficiales de las nanopartículas son tales que pueden ser internalizadas por las células T.

Las nanopartículas que comprenden copolímeros PLGA-PEG se describen en Patente U.S. 8.420.123 por ejemplo.

Las partículas pueden variar de tener una forma irregular a ser esféricas y/o de tener una superficie desigual o irregular a tener una superficie lisa. Las partículas esféricas tienen menos superficie en relación con las partículas de tamaño irregular. Si se utilizan partículas esféricas, se necesita menos reactivo debido a la reducción de la superficie. Por otra parte, una partícula de forma irregular tiene un área de superficie significativamente mayor que una partícula esférica, lo que proporciona una ventaja para el contenido de proteínas conjugadas por área de superficie y la superficie de contacto para las células. En algunas realizaciones, la nanopartícula asimétrica puede tener una forma asimétrica definida por una dimensión (a) a lo largo de un eje x, una dimensión (b) a lo largo de un eje y y una dimensión (c) a lo largo de un eje z, en la que al menos una de las dimensiones (a), (b) o (c) no es igual a al menos otra dimensión (a), (b) o (c). En algunas realizaciones, la forma asimétrica es un elipsoide, que puede describirse mediante una de las siguientes ecuaciones: $a > b = c$ (elipsoide prolato); $a > b > c$ (elipsoide triaxial); y $a = b > c$ (elipsoide oblato). Las nanopartículas asimétricas que pueden utilizarse de acuerdo con la invención se describen en WO 2013/086500.

Las partículas tienen un tamaño promedio de 20-200 nm, para permitir una mejor circulación de la sangre periférica y la penetración en los tejidos, incluido el tejido tumoral. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un tamaño promedio (por ejemplo, el diámetro o el eje mayor) de aproximadamente 50 nm a 200 nm, o de aproximadamente 100 nm a 200 nm, como por ejemplo de aproximadamente 120 nm a aproximadamente 180 nm o de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 nm. El término "aproximadamente", cuando se relaciona con una característica numérica, significa $\pm 10\%$. En algunas realizaciones, al menos el 90 % de las partículas están en el intervalo de aproximadamente 120 nm a aproximadamente 180 nm o en el intervalo de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 110 nm. Las partículas pueden ser de tamaño uniforme o pueden variar de tamaño, siendo el tamaño promedio de las partículas preferentemente el descrito anteriormente. En algunas realizaciones, las partículas son lo suficientemente pequeñas para aprovechar el "efecto EPR" (efecto de permeabilidad y retención mejoradas).

Los ligandos y complejos moleculares descritos en el presente documento pueden conjugarse químicamente con las perlas mediante cualquier procedimiento disponible. Los grupos funcionales para la unión del ligando incluyen PEG-COOH, PEG-NH₂, PEG-SH, PEG-maleimida, PEG-disulfuro de piridilo y PEG-acrilato. Véase, por ejemplo Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, Nueva York, 1996. Los grupos funcionales activadores incluyen los haluros de alquilo y de acilo, las aminas, los sulfhidrilos, los aldehídos, los enlaces insaturados, las hidrazidas, los isocianatos, los isotiocianatos, las cetonas, las azidas, los derivados de alquino, los anhídridos, los epóxidos, los carbonatos, los aminoxi, los derivados de furano y otros grupos conocidos por su activación para el enlace químico. Alternativamente, una molécula puede unirse a un soporte sólido mediante el uso de un reactivo de acoplamiento de moléculas pequeñas. Ejemplos no limitantes de reactivos de acoplamiento incluyen carbodiimidas, maleimidas, ésteres de N-hidroxisuccinimida, biscloretilaminas, aldehídos bifuncionales como el glutaraldehído, anhídridos y similares. En otras realizaciones, una molécula puede ser acoplada a un soporte sólido a través de la unión por afinidad, como una unión o acoplamiento de biotina-estreptavidina, como es bien conocido en el arte. Por ejemplo, la estreptavidina puede unirse a un soporte sólido mediante una unión covalente o no covalente, y una molécula biotinilada puede sintetizarse utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica.

Las químicas de activación permiten la adhesión específica y estable de moléculas a la superficie de los soportes sólidos. Existen numerosos procedimientos que pueden utilizarse para unir proteínas a grupos funcionales. Por ejemplo, el reticulante común glutaraldehído puede utilizarse para unir grupos aminos de proteínas a una superficie de soporte sólido aminado en un procedimiento de dos pasos. El enlace resultante es hidrolíticamente estable. Otros procedimientos incluyen el uso de reticuladores que contienen ésteres n-hidro-succinimidos (NHS) que reaccionan con las aminas de las proteínas, reticuladores que contienen halógenos activos que reaccionan con proteínas que contienen aminas, sulfhidrilos o histidinas, reticuladores que contienen epóxidos que reaccionan con aminas o grupos sulfhidrilos, conjugación entre grupos maleimida y grupos sulfhidrilos, y la formación de grupos aldehídos de proteínas mediante la oxidación de periodato de los restos de azúcares colgantes seguida de aminación reductora.

En algunas realizaciones, la partícula o perla es un polímero que comprende PLGA como polímero central, PLGA-PEG-maleimida, y un PLGA-PEG con tapa de éster. El grupo maleimida proporciona a las partículas formadas un revestimiento hidrofílico "sigiloso" (PEG) en la superficie exterior de la partícula, así como grupos funcionales unidos a este revestimiento que pueden utilizarse para la unión covalente de ligandos que tengan al menos un grupo sulfhidrilo (-SH) libre disponible. Por ejemplo, los ligandos HLA-Ig y/o anti-CD28 (u otro ligando de anticuerpo) pueden construirse sobre un marco de IgG4 humana (como se describe en el presente documento) que contiene una sustitución S473C

en el Fc. Este residuo de cisteína no apareado en el 473 del HLA-Ig o del anti-CD28 puede conjugarse con el grupo maleimida unido al PEG en condiciones de reducción leve. Es poco probable que las condiciones reductoras suaves desnaturalicen irreversiblemente las proteínas, especialmente la porción de HLA-beta-2-microglobulina de la molécula de HLA-Ig.

En una realización ejemplar, las nanopartículas tienen un núcleo (PLGA) que puede ajustarse para una tasa de biodegradación específica in vivo (ajustando la relación LA:GA y/o el peso molecular del polímero PLGA), una cubierta exterior hidrofílica que protege de la opsonización por proteínas séricas y de la eliminación de la circulación (actuando como "cepillos de PEG"), superficie funcionalizada con un control consistente de la densidad del ligando (relación estocástica de 1 molécula/grupo de maleimida) y orientación del ligando lejos del núcleo. En realizaciones ejemplares, el PLGA se basa en una relación LA:GA de 20:1 a 1:20, incluyendo composiciones de L/G de: 5/95, 10/90, 15/85, 20/80, 25/75, 30/70, 35/65, 40/60, 45/55, 50/50, 55/45, 60/40, 65/35, 70/30, 75/25, 80/20, 85/15, 90/10 o 95/5. El PLGA se degrada por hidrólisis de sus enlaces éster. El tiempo necesario para la degradación del PLGA está relacionado con la relación de monómeros: cuanto mayor sea el contenido de unidades de glicolida, menor será el tiempo necesario para la degradación en comparación con las unidades predominantes de lactida. Además, los polímeros que están recubiertos con ésteres (en contraposición al ácido carboxílico libre) tienen una semivida de degradación más larga.

En algunas realizaciones, el PLGA se basa en una relación LA:GA de 4:1 a 1:4, y en algunas realizaciones es de aproximadamente 1:1. En algunas realizaciones, el núcleo de PLGA tiene un peso molecular de aproximadamente 20K a aproximadamente 50K, o de aproximadamente 30K a aproximadamente 40K (por ejemplo, aproximadamente 35K). Los polímeros PLGA-PEG (incluyendo los polímeros PLGA-PEG-maleimida y PLGA-PEG-MeOH) tienen una porción de PLGA en el intervalo de 10K a 30K de peso molecular (por ejemplo, alrededor de 20K), y una porción de PEG con un peso molecular de alrededor de 2K a alrededor de 10K, como alrededor de 3K y/o alrededor de 5K. En diversas realizaciones, la relación de masa de los polímeros PLGA-PEG-maleimida y PLGA-PEG-MeOH es de aproximadamente 15:1 a aproximadamente 1:15, como por ejemplo de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, o de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:5. En algunas realizaciones, la relación de los polímeros PLGA-PEG-maleimida y PLGA-PEG-MeOH es de 4:1 a 1:4 aproximadamente, como por ejemplo, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4 aproximadamente. En otras realizaciones, la relación de masa de PLGA-PEG-maleimida y PLGA-PEG-MeOH está en el intervalo de 1:5 a aproximadamente 1:15, como por ejemplo aproximadamente 1:10. Esta relación se selecciona en algunas realizaciones para afinar la densidad del ligando para una óptima activación de las células T.

La relación de proteínas particulares en la partícula puede ser variada. Por ejemplo, las relaciones de complejo presentador de antígeno a anti-CD28 pueden ser al menos de aproximadamente 30:1, o al menos de aproximadamente 10:1, de aproximadamente 3:1, de aproximadamente 1:1, de aproximadamente 1:3; de aproximadamente 1:10, o de aproximadamente 1:30. En algunas realizaciones, la relación es de aproximadamente 5:1, de aproximadamente 4:1, de aproximadamente 3:1, de aproximadamente 2:1, de aproximadamente 1:1, de aproximadamente 1:2, de aproximadamente 1:3, de aproximadamente 1:4 o de aproximadamente 1:5. La cantidad total de proteína acoplada a las partículas puede ser de 1 a aproximadamente 100 µg, o de 1 a aproximadamente 50 µg, o de 1 a aproximadamente 10 µg por mg de partícula, o en algunas realizaciones, de 2 a 6 µg por mg de partícula. En algunas realizaciones, la densidad de ligandos de las partículas es de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^5 ligandos / μm^2 , o aproximadamente 10^4 ligandos / μm^2 . Por ejemplo, para las nanopartículas en el intervalo de 20 a 200 nm de tamaño, las nanopartículas tienen en promedio entre 5 y 1500 ligandos por partícula, como entre 10 y 1500 ligandos por partícula, o entre 10 y 1200 ligandos por partícula, o entre 10 y 1000 ligandos por partícula, o entre 10 y 800 ligandos por partícula. En algunas realizaciones, las partículas contienen menos de aproximadamente 500 ligandos por partícula, o menos de aproximadamente 400 ligandos por partícula, o menos de aproximadamente 300 ligandos por partícula, o menos de aproximadamente 100 ligandos por partícula, o menos de aproximadamente 90 ligandos por partícula, o menos de aproximadamente 80 ligandos por partícula, o menos de aproximadamente 70 ligandos por partícula, o menos de aproximadamente 60 ligandos por partícula, o menos de aproximadamente 50 ligandos por partícula, o menos de aproximadamente 40 ligandos por partícula, o menos de aproximadamente 30 ligandos por partícula, o menos de aproximadamente 20 ligandos por partícula, o menos de aproximadamente 10 ligandos por partícula, hasta aproximadamente 5 ligandos por partícula en algunas realizaciones.

En algunas realizaciones, la invención emplea constructos mínimos para la señal 1 y la señal 2 (como, para la señal 1, la cadena alfa de clase I monomérica con microglobulina $\beta 2$ enlazada, que es opcionalmente dimérica por fusión con una secuencia Ig justo por encima de la región de bisagra, y para la señal 2, un scFv como se describe) proporcionando así el potencial de autoensamblaje de nanopartículas. Por ejemplo, los polímeros PLGA-PEG o PLA-PEG se preparan con ligandos conjugados (por ejemplo, PLGA-PEG-señal 1 y PLGA-PEG-señal 2) y luego se mezclan en una relación específica de polímero con PLGA o PLA seguido de nano-precipitación de tal manera que el producto final de NP se forma durante el paso de mezcla/precipitación (auto-ensamblaje). Este procedimiento puede simplificar sustancialmente el procedimiento de fabricación.

En diversas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una perla o partícula polimérica, un anticuerpo anti-CD28 como se describe en el presente documento, y/o un complejo presentador de antígeno, como el complejo de fusión Ig HLA humanizado como se describe en el presente documento. La composición farmacéutica comprende además un péptido antigénico para su presentación a las células T, tal como se ha descrito, y que está coformulado con la perla o partícula conjugada. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica es estable en el estante, y en algunas realizaciones, se proporciona en forma liofilizada para la

reconstitución antes de la administración, o se proporciona en otra preparación farmacéutica "disponible en el mercado".

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende nanopartículas basadas en PLGA-PEG de 50 a 200 nm (por ejemplo, de 100 a 200 nm) de diámetro o de diámetro promedio, y que comprende anticuerpos anti-CD28 conjugados en superficie y complejos presentadores de antígenos. El anticuerpo anti-CD28 puede ser un anticuerpo humanizado, por ejemplo, como se describe en el presente documento, y puede ser un fragmento de anticuerpo como un fragmento variable de cadena única. El complejo presentador de antígeno comprende al menos una hendidura de unión a antígeno HLA. El complejo anti-CD28 y el HLA pueden acoplarse a las partículas por separado o juntos en la misma reacción. La composición farmacéutica incluye al menos un antígeno peptídico, como un antígeno tumoral (por ejemplo, MART-1 u otro antígeno descrito en el presente documento), y que está coformulado con las partículas sin ningún procedimiento de carga activa.

Los polímeros alternativos que pueden utilizarse en relación con las plataformas nano-aAPC descritas en el presente documento incluyen uno o más de los polímeros que contienen ciclodextrina, polímeros que contienen ciclodextrina catiónica, poli(ácido D,L-láctico-ácido co-glicólico) (PLGA), poli(caprolactona) (PCL), polímero de etileno-acetato de vinilo (EVA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido L-láctico) (PLLA) poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido L-láctico-ácido co-glicólico) (PLLGA), poli(D,L-lactida) (PDLA), poli(L-lactida) (PLLA), PLGA-b-poli(etilenglicol)-PLGA (PLGA-bPEG-PLGA), PLLA-bPEG-PLLA, PLGA-PEG-maleimida (PLGA-PEG-mal), PLA-PEG-maleimida, poli(D,L-lactida-co-caprolactona), poli(D,L-lactida-co-caprolactona-co-glicolida), poli(D,L-lactida-co-PEO~co-D,L-lactida), poli(D,L-lactida-co-PPO-co-D,L-lactida), polialcanoacralato de alquilo, poliuretano, poli-L-lisina (PLL), hidroxipropilmetacrilato (HPMA), polietilenglicol, ácido poli-L-glutámico, poli(hidroxiácidos) polianhídridos, poliortoésteres, poli(amidas de ésteres), poliamidas, poli(éteres de ésteres), policarbonatos, polialquilenos como el polietileno y el polipropileno, polialquilenglicoles como el poli(etilenglicol) (PEG) los óxidos de polialquileno (PEO), los tereftalatos de polialquileno como el poli(tereftalato de etileno), los alcoholes de polivinilo (PVA), los ésteres de polivinilo, los ésteres de polivinilo como el poli(acetato de vinilo), los haidos de polivinilo como el poli(cloruro de vinilo) (PVC) polivinilpirrolidona, polisiloxanos, poliestireno (PS), poliuretanos, celulosas derivadas como alquilcelulosas, hidroxialquilcelulosas, ésteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, polímeros de ácidos acrílicos, como polimetilmetacrilato (P MA), poli(etil(me)acrilato), poli(butil(me)acrilato), poli(isobutil(me)acrilato), poli(hexil(me)acrilato) poli(acrilato de isodecilo), poli(acrilato de laurilo), poli(acrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo) (ácidos poliacrílicos) y sus copolímeros y mezclas, polidioxanona y sus copolímeros, polihidroxialcanoatos, polipropileno fumarato), polioximetileno, poloxámeros, poli(orto)ésteres, poli(ácido butírico), poli(ácido valérico) poli(lactida-co-caprolactona), carbonato de trimetileno, polivinilpirrolidona, poliortoésteres, poliofosfocenos y poliofosfésteres, dendrímeros y sus derivados, así como mezclas y/o copolímeros en bloque de dos o más de estos polímeros.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento son útiles para la inmunoterapia, por ejemplo, en procedimientos para inducir la formación de células T citotóxicas específicas de antígeno, mediante la administración de una cantidad eficaz de la composición a un paciente que la necesite. El paciente puede ser un enfermo de cáncer.

Las plataformas de presentación de antígenos basadas en partículas descritas en el presente documento pueden administrarse a los pacientes por cualquier vía adecuada, incluida la administración intravenosa, la administración intraarterial, la administración subcutánea, la administración intradérmica, la administración intralinfática y la administración intratumoral. Los pacientes son tanto humanos como veterinarios.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende partículas poliméricas de PLGA-PEG que tienen un tamaño en el intervalo de 20 a 200 nm (por ejemplo, de 50 a 200 nm o de 100 a 200 nm en algunas realizaciones), una carga superficial de aproximadamente -0 a -20 mV (y de -5 a -10 mV en algunas realizaciones), y de aproximadamente 10 a 1500 ligandos de proteínas por partícula, o de 10 a aproximadamente 150 ligandos por partícula (por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 ligandos por partícula). Las partículas ejemplares tienen un índice de polidispersidad (PDI) de 0,3 o menos. En algunas realizaciones, los ligandos proteicos están acoplados a la partícula mediante la química sulfhidrido-maleimida. Los ligandos comprenden una población de ligandos de anticuerpos anti-CD28, y una población de ligandos HLA y uno o más péptidos antigénicos para su presentación a las células T. La composición comprende un portador farmacéuticamente aceptable para la administración intravenosa, intraarterial, subcutánea, intradérmica, intralinfática o intratumoral. En algunas realizaciones, la composición está formulada para la administración subcutánea.

En particular, las plataformas de presentación de antígenos pueden ser útiles para tratar a pacientes con enfermedades infecciosas, cáncer o enfermedades autoinmunes, o para proporcionar protección profiláctica a pacientes inmunodeprimidos.

Las enfermedades infecciosas que pueden tratarse incluyen las causadas por bacterias, virus, priones, hongos, parásitos, helmintos, etc. Tales enfermedades incluyen el SIDA, la hepatitis, la infección por CMV y el trastorno linfoproliferativo post-trasplante (PTLD). El CMV, por ejemplo, es el patógeno viral más común en los pacientes con trasplantes de órganos y es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los pacientes sometidos a trasplantes de médula ósea o de células madre de sangre periférica (Zaia, Hematol. Oncol. Clin. North Am. 4, 603-23,

1990). Esto se debe al estado de inmunodeficiencia de estos pacientes, que permite la reactivación del virus latente en los pacientes seropositivos o la infección oportunista en los individuos seronegativos. El tratamiento actual se centra en el uso de compuestos antivirales como el ganciclovir, que tienen inconvenientes, siendo el más importante el desarrollo de CMV resistentes a los fármacos. Una alternativa útil a estos tratamientos es un régimen inmunoterapéutico profiláctico que implique la generación de CTL específicos del virus derivados del paciente o de un donante apropiado antes de iniciar el procedimiento de trasplante.

La PTLD se produce en una fracción significativa de pacientes trasplantados y es el resultado de la infección por el virus de Epstein-Barr (VEB). Se cree que la infección por el VEB está presente en aproximadamente el 90 % de la población adulta de los Estados Unidos (Anagnostopoulos & Hummel, *Histopathology* 29, 291-2) 15, 1996). La replicación e infección virales activas se mantienen bajo control por el sistema inmunitario, pero, como en los casos de CMV, los individuos inmunocomprometidos por las terapias de trasplante pierden las poblaciones de células T de control, lo que permite la reactivación viral. Esto representa un grave impedimento para los protocolos de trasplante. El VEB también puede estar implicado en la promoción de tumores en una variedad de cánceres hematológicos y no hematológicos. También existe una fuerte asociación entre el VEB y los carcinomas nasofaríngeos. Así, un tratamiento profiláctico con células T específicas del VEB ofrece una excelente alternativa a las terapias actuales.

Los cánceres que pueden tratarse según la invención incluyen el melanoma, los carcinomas, por ejemplo colon, cáncer de cabeza y cuello, duodenal, de próstata, de mama, de pulmón, de ovario, ductal, de colon, hepático, pancreático, renal, de endometrio, de estómago, de mucosa oral displásica, de poliposis, de cáncer oral invasivo, de carcinoma de pulmón de células no pequeñas, de carcinoma urinario de células transicionales y escamosas, etc.; neoplasias neurológicas, por ejemplo, neuroblastoma, gliomas, etc.; neoplasias hematológicas, por ejemplo leucemia mielógena crónica, leucemia aguda infantil, linfomas no-Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, células T cutáneas malignas, micosis fungoide, linfoma cutáneo de células T no-MF, papulosis linfomatoide, hiperplasia linfocítica cutánea rica en células T, bulus penfigoide, lupus eritematoso discoide, liquen plano, etc.; y similares. Véase, por ejemplo Mackensen et al, *Int. J. Cancer* 86, 385-92, 2000 Jonuleit et al., *Int. J. Cancer* 93, 243-51, 2001; Lan et al., *J. Immunotherapy* 24, 66-78, 2001 Meidenbauer et al, *J. Immunol.* 170(4), 2161-69, 2003.

Se divulga un procedimiento para tratar el cáncer, incluidos los cánceres identificados anteriormente, mediante la administración de la composición farmacéutica descrita en el presente documento para activar las células T que tienen actividad antitumoral. La terapia puede proporcionarse junto con uno o más inhibidores del punto de control inmunitario, como Nivolumab, Pembrolizumab e Ipilimumab. La terapia adicional puede ser antiCTLA4 o anti-PDI, o anti-PD-L1. La terapia adicional o el inhibidor del punto de control puede administrarse por separado a través de su régimen convencional, o puede administrarse como un ligando adicional a las nanopartículas descritas en el presente documento, o unido a una población separada de nanopartículas. Los uno o más inhibidores de puntos de control inmunitarios pueden proporcionarse como terapia inicial, y la terapia con las aAPC descritas en el presente documento se inicia posteriormente, por ejemplo, después de entre 1 y 8 semanas de terapia con inhibidores de puntos de control, o después de entre 2 y 4 semanas de terapia con inhibidores de puntos de control. Los uno o más inhibidores de puntos de control pueden administrarse de forma concomitante con la terapia de nanopartículas, por ejemplo al inicio de la terapia y cada dos semanas aproximadamente, o al inicio de la terapia y cada dos semanas aproximadamente para los uno o más inhibidores de puntos de control y cada cuatro semanas aproximadamente para la terapia de nanopartículas. El paciente puede ser resistente o mostrar sólo una respuesta parcial o transitoria a la terapia con inhibidores de puntos de control, y las aAPCs descritas en el presente documento mejoran la regresión del tumor en estos pacientes. Para los cánceres que son típicamente resistentes a la terapia de inhibidores de puntos de control, las composiciones descritas en el presente documento pueden ampliar el uso exitoso de los inhibidores de puntos de control a dichos cánceres.

El antígeno peptídico puede seleccionarse de forma personalizada para el paciente, basándose en un análisis del tumor del paciente. Por ejemplo, un procedimiento descrito por Ionov Y., *A high throughput method for identifying personalized tumor-associated antigens*, *Oncotarget* 1(2):148-155 (2010), u otro procedimiento. Las nanopartículas pueden ser suministradas (en una base "disponible en el mercado"), y los antígenos tumorales seleccionados y cargados en una base personalizada.

Las nano-aAPCs pueden utilizarse como una vacuna de refuerzo, después de la terapia de células T adoptiva, en la que las células T ingenuas del paciente o las células T de un donante con HLA compatible se expanden *ex vivo*, y se administran al paciente. La composición de nano aAPC puede administrarse de 1 a 10 veces en el transcurso de 4 meses a 1 año aproximadamente para mejorar la inmunidad contra el cáncer en estas realizaciones.

Las enfermedades autoinmunes que pueden tratarse incluyen el asma, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, la diabetes de tipo I, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, la psoriasis, la miastenia gravis, el síndrome de Goodpasture, la enfermedad de Graves, el pénfigo vulgar, la enfermedad de Addison, la dermatitis herpetiforme, la enfermedad celíaca y la tiroiditis de Hashimoto.

Las células T auxiliares específicas de antígeno pueden utilizarse para activar los macrófagos o para activar las células B con el fin de producir anticuerpos específicos que pueden utilizarse, por ejemplo, para tratar enfermedades infecciosas y cáncer. Las propias células B productoras de anticuerpos también pueden utilizarse para este fin.

Se divulgan otros polinucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento, así como células huésped que las expresan.

La presente invención se ilustra además con los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

5 **Ejemplo 1: Diseño de Regiones Variables Humanizadas de la Línea Germinal y Secuencias de la Región Constante Humana**

Este Ejemplo demuestra, entre otras cosas, un diseño de secuencias para anticuerpos humanizados de línea germinal (injetados con CDR) a partir de una plantilla de anticuerpo anti-CD28 de ratón; un diseño de secuencias de región constante humana que incluye IgG4 humana que contiene la mutación estabilizadora de bisagra S241P (numeración de Kabat), la mutación L248E (numeración de Kabat) para eliminar la unión residual del receptor Fc gamma y un residuo Cys (S473C, numeración de Kabat) adecuado para acoplar el anticuerpo; un diseño de una variante del dominio V del anticuerpo humanizado de línea germinal con potencial de no unión a CD28; un diseño de una secuencia de enlace para la fusión de HLA-A*0201 al N-terminal de los anticuerpos humanizados de línea germinal que no contiene potenciales epítomos de células T.

El anticuerpo anti-CD28 de partida fue el anticuerpo monoclonal murino 9.3 (Tan et al. J. Exp. Med. 1993 177:165). Se produjeron modelos estructurales de las regiones V del anticuerpo 9.3 utilizando Swiss PDB y se analizaron para identificar los aminoácidos de las regiones V que probablemente fueran esenciales para las propiedades de unión del anticuerpo. Todos los residuos contenidos en las CDR (utilizando las definiciones de Kabat y Chothia) junto con una serie de residuos marco se consideraron de importancia potencial para la unión. Tanto las secuencias VH como Vk del anti-CD28 contienen residuos típicos del marco (Fw) y los motivos CDR 1, 2 y 3 son comparables a muchos anticuerpos murinos.

Para la humanización, se seleccionó el Fw de la línea germinal humana IGHV4-59 como plantilla para la cadena pesada (con preferencia al IGHV3/OR16-10 seleccionado por Tan et al. J. Immunol 2002 169:1119-1125). El Fw de la línea germinal IGKV4-01 fue seleccionado como plantilla para la cadena ligera. Estos Fws tienen ambos un 62 % de homología con sus respectivas secuencias VH y Vk murinas. Los CDR murinos se injertaron en estos Fws y también se incluyó un número variable de residuos Fw murinos para crear tres variantes VH humanizadas y tres variantes Vk humanizadas (**FIGURAS 1-6**).

Para la cadena pesada Fw, se pensó que los residuos 1 y 3 de Fw1 eran importantes para la unión del antígeno ya que son adyacentes al bolsillo de unión, mientras que se consideró que el residuo 6 afectaba a la conformación tanto de la cadena beta que soportaba los residuos 1 y 3 como a la conformación de la CDR3. Por lo tanto, estos residuos Fw murinos se mantuvieron en todas las variantes.

En Fw2, se consideró que el residuo 37 era importante para mantener la interfaz entre la VH y la Vk, mientras que se consideró que el residuo 48 apoyaba la conformación de la CDR2; por lo tanto, ambos residuos se conservaron en todas las variantes.

En Fw3, los residuos 73, 76 y 78 contactan directamente con la CDR1, mientras que el residuo 71 contacta tanto con la CDR1 como con la CDR2; por lo tanto, es probable que estos residuos sean necesarios para la unión al antígeno (dependiendo de la contribución de la CDR1 y la CDR2) y, por tanto, se mantuvieron en todas las variantes. El residuo 71 puede a veces afectar indirectamente a la conformación de la CDR1 al influir en la conformación de los residuos 71 a 78, mientras que los residuos 82a y 82c pueden también influir indirectamente en la conformación de la CDR2. Por lo tanto, estos residuos se mantuvieron sólo en VH1. Los residuos 67 y 82 son adyacentes en la estructura tridimensional e interactúan para llenar el espacio que puede afectar a la conformación de la CDR2 y potencialmente influir en las cadenas beta que soportan las CDRs 1 y 3. Por lo tanto, estos residuos se mantuvieron en las variantes VH1 y VH2.

Para la cadena ligera Fw, el residuo 3 de Fw1 es adyacente al bolsillo de unión y puede estar directamente implicado en la unión del antígeno, mientras que el residuo 4 apoya directamente la conformación de la CDR3. Por lo tanto, estos residuos Fw murinos se mantuvieron en todas las variantes.

En Fw2, el residuo 49 apoya la conformación de CDR2 y también es crítico para la interfaz entre las cadenas pesadas y ligeras donde apoya directamente la conformación de la cadena pesada CDR3, por lo que se mantuvo en todas las variantes.

En Fw3, los residuos 85 y 87 se consideraron importantes para la interfaz de las cadenas pesadas y ligeras y también para apoyar la conformación de CDR3 y, por lo tanto, se mantuvieron en todas las variantes. Se consideró que el residuo 80 podía tener efectos indirectos en la conformación de las CDRs 2 y 3 y se mantuvo sólo en Vk1. El residuo 70 suele formar un puente de sal con el residuo R24 de la cadena ligera y, por tanto, tiene importantes efectos conformacionales en el dominio Vk. En el anticuerpo anti-CD28, este puente salino está ausente (ya que el residuo 70 es N en lugar de D) y la introducción de esta interacción podría ser desventajosa; sin embargo, en el anticuerpo murino

N70 está glicosilado (NFS) y sería beneficioso eliminarlo durante la humanización; por lo tanto, la N murina se mantuvo en Vk1 y Vk2, pero se cambió a D en Vk3.

Las secuencias de la región constante basadas en la IgG4/k humana se diseñaron para incorporar una mutación estabilizadora de la bisagra (S241P) y una mutación en la bisagra inferior que elimina la unión residual del receptor Fc gamma (L248E). También se incluyó un residuo de cisteína cerca del C-terminal del Fc para fines de acoplamiento químico (S473C). La secuencia de la región constante de la cadena pesada de IgG4 modificada se muestra en **la FIGURA 7**, junto con la secuencia de la región constante de la cadena ligera κ (**FIGURA 8**).

Se diseñó un dominio VH adicional para la no unión potencial a CD28 y esta secuencia se muestra en **la FIGURA 9**. El análisis de las secuencias de la región V murina sugirió (a partir del grado de mutación somática de las regiones V de la línea germinal de los ratones) que el VH era probablemente el principal contribuyente a la unión de CD28. Por lo tanto, sólo se diseñó una variante potencial de VH humanizada no vinculante. Esta variante no contiene ningún residuo de Fw de ratón para reconstituir las conformaciones correctas de CDR y también contiene tres mutaciones en CDRH3 en residuos que probablemente sean críticos para la unión (Y100A, Y100aA, Y100bA).

Ejemplo 2: Diseño de enlazadores para la fusión de HLA-A *02:01 con anticuerpos humanizados

Se construyeron enlazadores para la fusión de HLA-A*02:01 (número de acceso al IMGT HLA00005) con el N-terminal de los anticuerpos humanizados anti-CD28 y se incorporó el análisis por iTope™ y TCED™ para eliminar la inmunogenicidad potencial.

El software iTope™ predice las interacciones favorables entre las cadenas laterales de aminoácidos de un péptido y los bolsillos de unión específicos (en particular las posiciones de los bolsillos; p1, p4, p6, p7 y p9) dentro de los surcos de unión abiertos de 34 alelos humanos del MHC de clase II. Estos alelos representan los alelos HLA-DR más comunes encontrados en todo el mundo, sin atribuir ninguna ponderación a los que se encuentran con mayor prevalencia en una población étnica en particular. Veinte de los alelos contienen la configuración "abierta" de p1 y catorce contienen la configuración "cerrada" en la que la glicina de la posición 83 se sustituye por una valina. La localización de los residuos clave de la unión se consigue mediante la generación *in silico* de péptidos de 9mer que se solapan en un aminoácido que abarca la secuencia de la proteína de prueba. Las comparaciones con experimentos físicos de unión al MHC clase II han demostrado que iTope™ puede utilizarse para discriminar con éxito y con gran precisión entre los péptidos que se unen o no a las moléculas del MHC clase II. Cualquier limitación del análisis *in silico* de la unión al MHC clase II se reduce utilizando el TCED™, que contiene las secuencias de una gran base de datos de péptidos (>10.000 péptidos) derivados de secuencias previamente cribadas en los ensayos de mapeo de epítomos de células T *ex vivo* de EpiScreen™. Así, el TCED™ puede utilizarse para buscar cualquier secuencia de prueba frente a secuencias de anticuerpos y proteínas no relacionadas para encontrar correlaciones con la inmunogenicidad real *ex vivo*.

El análisis de las secuencias enlazadoras utilizando iTope™ se realizó con 9 mers superpuestos que abarcaban las secuencias enlazadoras que se probaron contra cada uno de los 34 alelos MHC de clase II. Cada 9mer se puntuó en función del potencial de "ajuste" y de las interacciones con las moléculas MHC de clase II. Las puntuaciones de los péptidos calculadas por el software se sitúan entre 0 y 1. Se destacaron los péptidos no germinales que produjeron una puntuación media de unión alta (>0,55 en la función de puntuación de iTope™) y, si ≥ 50 % de los péptidos de unión al MHC de clase II (es decir, 17 de 34 alelos) tenían una afinidad de unión alta (puntuación >0,6), dichos péptidos se definieron como péptidos de unión al MHC de clase II "promiscuos de alta afinidad" (que se consideran de alto riesgo por contener epítomos de células T CD4+). Los péptidos con ≥ 50 % de los péptidos de unión al MHC clase II con una puntuación >0,55 (pero sin una mayoría >0,6) se definieron como péptidos de unión al MHC clase II "promiscuos de afinidad moderada". El análisis posterior de las secuencias se realizó con el TCED™. Las secuencias se utilizaron para interrogar al TCED™ mediante la búsqueda BLAST con el fin de identificar cualquier homología de secuencia elevada entre péptidos (epítomos de células T) de proteínas no relacionadas que estimularan las respuestas de las células T en estudios EpiScreen™ anteriores.

Las secuencias utilizadas por Schneck *et al.* incorporaron dos enlazadores, uno en el N-terminal de HLA-A*02:01 para enlazar con una secuencia señal N-terminal y otro en el C-terminal para la fusión con el dominio VH anti-CD28 (Véase **la FIGURA 9** como ejemplo). Para el enlazador N-terminal, se analizó la secuencia desde el sitio de corte de la secuencia señal a través del enlazador e incluyendo los primeros 8 aminoácidos de la proteína madura HLA-A*02:01. Para el enlazador C-terminal, se analizó la secuencia desde los 8 aminoácidos terminales del dominio HLA-A*02:01 $\alpha 3$, a través de la secuencia del enlazador y hasta los primeros 8 aminoácidos del dominio VH anti-CD28.

Los péptidos con puntuaciones de unión >0,6 (alta afinidad) se unen a la mayoría (≥ 17) de los alelos del MHC de clase II (denominados ligantes promiscuos de alta afinidad). Los aglutinantes de afinidad moderada con una puntuación de unión entre 0,55 y 0,6 se unen a ≥ 17 alelos del MHC de clase II. Se descubrió que el enlazador N-terminal contenía dos secuencias promiscuas de unión al MHC clase II, una de alta afinidad (con el ancla p1 en la posición 2) y otra de afinidad moderada (con el ancla p1 en la posición 4). Se encontró que el enlazador C-terminal contiene un péptido promiscuo de afinidad moderada de unión al MHC clase II con anclaje p1 en la posición 11.

Se realizó una búsqueda BLAST en la base de datos de epítomos de células T de Antitope (TCED™) utilizando las mismas secuencias utilizadas en el análisis iTope™ para determinar cualquier homología con epítomos previamente identificados. El TCED™ se utiliza para buscar cualquier secuencia de prueba frente a una gran base de datos (>10.000 péptidos) de péptidos derivados de secuencias no relacionadas que han sido probadas en ensayos de mapeo de epítomos de células T EpiScreen™. Ninguna de las secuencias enlazadoras se encontró que contenía ningún "acierto" en el TCED™.

El iTope™ se utilizó además para evaluar los cambios de secuencia en los enlazadores con el fin de reducir su propensión a la unión al MHC de clase II. Se observó que el enlazador N-terminal podría eliminarse por completo de manera que el N-terminal de HLA-A*02:01 se fusionara directamente con la secuencia de señal proporcionada en el vector pBFksr o con su secuencia de señal natural. Esto garantizaría que el N-terminal de la proteína de fusión sólo contenga la secuencia de la línea germinal humana y evitaría el riesgo de epítomos de células T. Las secuencias de enlace recomendadas a continuación reducen la unión del MHC clase II a niveles residuales de fondo (<5 de los alelos unidos por cualquier 9mer), y proporcionan sitios de restricción adecuados para la clonación (aunque ambas secuencias requerirán la modificación del vector):

Enlazador N-terminal

Q V Q L T R E G S G S H S M R Y F
CAGGTCCAACCTGacgcgtGAGGGGTCCGGCTCTCACTCCATGAGGTATTTTC
Vector | Linker | HLA-A*02:01

Enlazador C-terminal

E G L P K P L T W A R E V S E V K L Q
GAGGGTTTGCCTCAAGCCCTCACCTGGGctcgaqAGGTGAGCGAGGTCAAGCTGCAG
HLA-A*02:01 | Linker | Anti-CD28

Ejemplo 3: Optimización del codón de las secuencias y clonación de la expresión

Los codones se optimizaron utilizando GeneOptimizer®, y las secuencias optimizadas se clonaron para su expresión como se muestra a continuación.

Las secuencias fueron diseñadas con sitios de restricción *PmeI*, la secuencia Kozak y el péptido señal para la expresión en células NS0. La traducción comienza inmediatamente después de la secuencia de Kozak.

La secuencia completa de aminoácidos traducida de la fusión HLA-IgG4HC se muestra en la **FIGURA 10**.

La secuencia traducida de LC3 (VK3) se muestra en la **FIGURA 11**.

La secuencia traducida para HC1 se muestra en la **FIGURA 12**.

La secuencia traducida para HC2 se muestra en la **FIGURA 13**.

También se expresó la $\beta 2$ microglobulina humana.

Ejemplo 4: Expresión en células NS0

Basándose en los datos de afinidad de Biacore y en otras consideraciones, se seleccionaron las combinaciones de cadena pesada y cadena ligera HC1::LC3 y HC2::LC3 como candidatos primarios y secundarios, respectivamente, para el desarrollo de la línea celular StableFast-NS0.

El mapa vectorial final para el vector de expresión bicistrónico pBFksr::HC1::LC3 para la generación de la línea celular STABLEFAST-NS0 se representa en la **FIGURA 14**. La construcción de pBFksr::HC2::LC3 se realizó con los mismos enfoques.

Las células parentales NS0 se expandieron en un medio de crecimiento suplementado sin suero. Una vez establecido el cultivo sanitario, se transfectaron diez millones de células (10×10^6) con 45 μ g de ADN del vector de expresión linealizado (Δ PvuI). Se dejó que las células se recuperaran durante 24 horas a granel en medio de crecimiento. Tras la recuperación, las células se lavaron en medio selectivo suplementado sin suero (colesterol), se resuspendieron en el medio selectivo y se distribuyeron en placas de 40×96 pocillos a 200 μ l por pocillo. La distribución real fue de 1140 células/pocillo y 840 células/pocillo para HC1::LC3 y HC2::LC3, respectivamente. Las placas se incubaron a 37°C, 5 % de CO₂ durante 1 semana y se alimentaron con medio selectivo suplementado con rojo de fenol. A las dos semanas después de la transfección, numerosos pocillos crecían activamente según el cambio de color del medio de rojo a amarillo.

Un total de 1.127 pocillos de la transfección de HC1::LC3 se examinaron para la expresión de IgG humana por ELISA. Se examinaron un total de 612 pocillos de la transfección de HC2::LC3. Basándose en la concentración de IgG, un total de 290 y 101 líneas celulares fueron escaladas a placas de 24 pocillos para HC1::LC3 y HC2::LC3,

respectivamente. Se utilizó un ensayo de productividad de 24 horas para seleccionar los mejores expresadores para su posterior análisis. Brevemente, se sembraron placas de 24 pocillos con 5×10^5 células en 500 μ l de medio fresco. Después de 24 horas, los sobrenadantes se analizaron mediante ELISA. Basándose en la concentración de IgG, un total de 60 y 24 líneas celulares fueron escaladas a placas de 6 pocillos para HC1::LC3 y HC2::LC3, respectivamente.

- 5 Se utilizó un ensayo de productividad específica de 3 días para seleccionar los mejores expresadores para su posterior análisis. Brevemente, se sembraron placas de 6 pocillos con 4×10^5 células en 1,5 ml de medio fresco. Después de 3 días, se contaron las células y se analizaron los sobrenadantes mediante ELISA. A partir de la concentración de IgG y del crecimiento, se puede calcular la tasa de productividad específica media o SPR en pg/célula/día. Sobre la base de la SPR relativa, un total de 20 y 10 líneas celulares fueron escaladas a frascos T-75 para HC1::LC3 y HC2::LC3, respectivamente. El ensayo SPR de 3 días se repitió a escala T-75 para seleccionar las líneas celulares finales para la adaptación de la suspensión y el escalado para la producción de mAb.

Cinco líneas celulares para cada mAb se escalaron a un cultivo de agitación de 30 ml y se reevaluaron para la SPR y el crecimiento. Todas las líneas de suspensión se han banqueado. La línea celular que mejor funcionó para cada mAb se escaló a un cultivo en espiral para su producción a pequeña escala.

- 15 Para la proteína de fusión HLA-IgG4, se construyó el vector de expresión bicistrónico pBFksr::HLA-IgG4::LC3 para la generación de la línea celular STABLEFAST-NSO. El mapa vectorial se muestra en la **FIGURA 15**. También se creó un casete de expresión y un vector que contiene el gen de la $\beta 2$ microglobulina humana para un vector de expresión tricistrónico que codifica las tres subunidades de la proteína de fusión (fusión de la cadena pesada HLA-IgG4 humana, la cadena ligera α -CD28 [LC3] y la $\beta 2$ microglobulina humana). El constructo tricistrónico se muestra en la **FIGURA 16**. La expresión de los tres genes se confirmó en el cultivo transitorio de HEK293 mediante ELISA y análisis de transferencia western del sobrenadante.

Ejemplo 5: Caracterización funcional de ligandos humanizados

- El anticuerpo monoclonal humanizado contra CD28 fue probado para su capacidad de inducir la expansión de PBMCs recién aisladas en placas recubiertas de mAb. Como se muestra en la **FIGURA 17**, el anti-CD28 humanizado funciona de forma similar al cierre madre y no es un superagonista.

- El anticuerpo monoclonal humanizado se probó para su capacidad de teñir CD28 en una línea de células T humanas. Los resultados se muestran en la **FIGURA 18**. El panel (A) muestra la tinción con mAb CD8 murino antihumano (clon 9.3, isotipo IgG2a). Los picos de izquierda a derecha son: células sin teñir, anti-IgG2a FITC, y anti-CD28 + anti-IgG2a FITC. El panel (B) muestra la tinción con anti-CD28 humanizado (isotipo IgG4). Los picos de izquierda a derecha son: células sin teñir, anti-IgG4 PE, anti-CD28 (35 ng) + anti-IgG4 PE, anti-CD28 (1 μ g) + anti-IgG4 PE. La tinción con anti-CD28 humanizado puede bloquearse con el mAb Clon 9.3 (no mostrado).

- Después de la purificación del HLA-Ig, la eficiencia de carga del péptido del antígeno se comprueba por ELISA utilizando mAb anti-HLA dependiente de la conformación para capturar la proteína cargada con el péptido (como se describe en Current protocols in Immunology Chapter 17.2). Se prevén eficiencias de carga reproducibles de ~90 % para péptidos específicos (es decir, restricción MHC correcta), en comparación con el 0 % para péptidos no específicos (es decir, MHC no coincidente).

Ejemplo 6: Formulaciones de nanopartículas

- El siguiente ejemplo demuestra la síntesis de una nanopartícula con un núcleo formado por PLGA (LA:GA = 1:1) con un peso molecular de 35K. La corona de la partícula está formada por un copolímero de PEG a partir de una mezcla de PLGA-PEG-COOH o PLGA-PEG-maleimida, y PLGA-mPEG (metoxi PEG). Los grupos funcionales finales COOH y maleimida permiten la conjugación de polipéptidos. El metoxiPEG es inerte con respecto a los grupos funcionales finales de la cadena de PEG. Las porciones de PLGA tienen pesos moleculares de 10-30K (por ejemplo, alrededor de 20K), y el peso molecular de la porción de PEG es de 3 y 5K. Para este ejemplo, la nanopartícula está formada por un 50 % de núcleo de PLGA (35K) y una mezcla de 25 % de PLGA-PEG-COOH y 25 % de PLGA-mPEG. La relación de PLGA-PEG-COOH (o maleimida) y PLGA-mPEG permite un ajuste fino de la densidad del ligando en la superficie de la partícula. Se pueden preparar partículas similares utilizando otros polímeros, como PLA y PLA-PEG, incluso con pesos moleculares y densidad de grupos funcionales similares.

- El núcleo interno de PLGA proporciona la estructura y el tamaño, y es un impulsor de la tasa de degradación. La infiltración de la nanopartícula del núcleo con agua provoca la hidrólisis de los polímeros de PLGA y, en última instancia, la degradación de la nanopartícula.

- El polímero PLGA-mPEG es inerte con respecto a los grupos funcionales que pueden utilizarse para conjugar ligandos de proteínas/péptidos y, por lo tanto, sirve para proporcionar un revestimiento de corona a la nanopartícula central que se extiende fuera del núcleo de PLGA hidrófobo con una capa exterior de PEG hidrofílica. Entre otras cosas, esto ayuda a prevenir la opsonización y la eliminación de las nanopartículas por el sistema fagocítico mononuclear (MPS), incluso limitando la unión de las proteínas del suero (por ejemplo, la albúmina).

El PLGA-PEG-COOH y el PLGA-PEG-maleimida cumplen la misma función que el PLGA-mPEG, y además, cada cadena de PEG del copolímero está terminada con un grupo funcional. Tras la formación de la nanopartícula completa, los grupos COOH terminales del PLGA-PEG pueden activarse utilizando EDC-Sulfo-NHS para crear grupos reactivos que formen enlaces peptídicos con los grupos aminos primarios disponibles en las proteínas/péptidos. Dado que esta estrategia no controla qué grupos de aminos primarios disponibles se conjugarán con los grupos -COOH activados en los polímeros PLGA-PEG, no se controla la orientación de los ligandos en la superficie de la nanopartícula y, por tanto, no todos serán biológicamente activos.

Una alternativa es preparar ligandos que contengan un residuo de cisteína no apareado, como en la región Fc distal de una IgG monoclonal (IgG1 para los ligandos de ratón; IgG4 para los ligandos humanos). Esta cisteína no apareada sirve como sitio específico para la conjugación con el PLGA-PEG-maleimida (u otro grupo funcional adecuado que pueda utilizarse para formar enlaces covalentes con los residuos de cisteína no apareados). Esto permite que cada ligando se conjuge en un sitio específico que debería dar como resultado que la mayoría de los ligandos de la superficie se conjuguen con una orientación externa que apoye la actividad biológica. Por ejemplo, la estrategia tiene la porción de unión de cada ligando que se extiende lejos de la porción hidrófoba de PLGA de la nanopartícula y ligeramente externa a la cadena hidrofílica de PEG de la corona.

Las nanopartículas están en el intervalo de tamaño de 20 a 200 nm; el índice de polidispersidad (PDI) es 2 o menos (por ejemplo, 0,3 o menos en algunas realizaciones); y el potencial zeta (carga superficial) es de -15 mV a 0 mV. Se espera que las nanopartículas con esta composición, tamaño y carga tengan propiedades beneficiosas para la PK/ADME in vivo. Específicamente, son lo suficientemente pequeñas (<200 nm) para traficar a los tejidos objetivo, incluyendo el microambiente tumoral, así como para moverse entre la sangre y la linfa; su capa de PEG hidrofílica y su carga ligeramente negativa ayudarán a retardar la unión de las proteínas del suero y la opsonización de las nanopartículas que resultaría en la eliminación de la circulación por las células del MPS antes de la distribución a los tejidos objetivo; la mezcla de polímeros debería dar lugar a una tasa de biodegradación medida en días hasta 2 semanas; y los ligandos proteicos orientados externamente deberían proporcionar una actividad biológica máxima con respecto a la unión de las células T con los TCRs y los receptores coestimuladores afines (por ejemplo, CD28, 4-1BB). por ejemplo, CD28, 4-1BB). Además, en algunas realizaciones, el núcleo hidrófobo de las nanopartículas podría cargarse con una carga útil soluble (por ejemplo, IL-2, anti-TGF- β , IL-21 o un fármaco de molécula pequeña) durante la formulación.

Composición polimérica ejemplar (peso total de los polímeros 100 mg):

PLGA 35KDa	50 % p/p
Grupo funcional PLGA-PEG 20KDa-5KDa	25 % p/p
PLGA-PEG-MeOH 20KDa-5KDa	25 % p/p

Los polímeros se disolvieron en 1 ml de diclorometano, se añadieron 2,3 ml de PVA al 5 % (20KDa) y la solución se emulsionó utilizando un sonicador de sonda. La emulsión se añadió a 46 ml de solución de PVA al 0,5 % y se agitó durante 2 horas hasta que el disolvente se evaporó por completo.

Para la purificación, las partículas se centrifugaron a 3.700 rpm durante 30 minutos, se filtraron a través de un filtro de 0,45 micrones y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos para eliminar las partículas más grandes. Las partículas se lavaron con agua desionizada mediante filtración centrífuga (corte 100KDa) a 2000 rpm para eliminar el PVA.

Se utilizó el siguiente protocolo para la conjugación de los ligandos. Se dispersaron 40 mg de nanopartículas en tampón HEPES 10mM de pH 6 a una concentración de 1mg/ml. Se añadieron 80 mg de EDC y 89,16 mg de S-NHS a la solución y se agitó durante 30 minutos. El exceso de EDC y S-NHS se eliminó mediante un filtro centrífugo a 2500 rpm. Las partículas se volvieron a dispersar en una concentración de 1 mg/ml en PBS y se añadió a la solución una mezcla de Kb-Ig y anti-CD28 correspondiente a 8 mg por mg de partículas. Las partículas se agitaron a 4°C durante la noche.

Las partículas se lavaron con PBS (17.000 rpm x 50 min). Tras el segundo lavado, las partículas se reconstituyeron en una solución de sacarosa de 100 mg/ml (el total de sacarosa añadido fue de 4 mg).

Se determinaron las propiedades de las partículas.

	Antes de la modificación			Conjugación posterior al ligando		
	Tamaño (DI)	PDI (DI)	z-potencial (10mm NaCl)	Tamaño (DI)	PDI (DI)	z-potencial (10mm NaCl)
	157,2	0,143	-5,48	163,1	0,189	-8,74
	156,3	0,174	-6,15	162,1	0,160	-8,78
	155,8	0,156	-5,99	162,5	0,165	-7,72
Promedio	156,4	0,158	-5,87	162,6	0,171	-8,41
Desv. Est.	0,7	0,016	0,35	0,5	0,016	0,60

Ejemplo 7: Fusiones de la región bisagra Fc

Los ligandos de presentación de antígenos diméricos se diseñaron fusionando el complejo de presentación de antígenos (como H2-Kb o HLA-2) directamente a la región bisagra de la Ig. La proteína H2-Kb Fc hinge contiene el dominio extracelular Kb de clase I de ratón fusionado a la porción hinge-CH2-CH3 de una IgG1 de ratón, para la que se ha diseñado un residuo de cisteína no apareado que sustituye a un residuo de serina en la posición 231 de la cadena pesada. Este diseño se muestra en **la FIGURA 19**.

La FIGURA 27 muestra que las nano-aAPCs basadas en la proteína bisagra Fc Kb-SIY tiñen específicamente a las células T 2C diana conocidas.

La FIGURA 29 muestra la expansión de células T 2C específicas de Kb (A) y células T pmel específicas de Db-gp100 utilizando nano aAPCs que contienen constructos de dímeros de bisagra. Se utilizaron perlas Miltenyi y perlas Dyna (de aproximadamente 4,5 micrones de diámetro) para la comparación. Las propiedades físicas de los lotes NI-19, NI-21, NI-22 (que contienen el dímero de bisagra K^b), y los lotes NI-24 y NI-25 (que contienen el dímero de bisagra D^b) se muestran en **la FIGURA 32**. NI-22 es un control negativo.

Ejemplo 8: Ejemplos de química de nano-aAPC

Se prepararon nano-aAPCs de PLGA y PLGA-PEG-COOH con ligandos conjugados mediante aminas primarias disponibles. Las partículas de PLGA basadas en PLGA 40 (200 nm) no mostraron suficiente estabilidad. Partículas a base de PLGA-PEG-COOH (40K/3K) : PLGA-mPEG (17K/3K), y que tienen una relación PEG:mPEG de 1:4, mostraron una buena estabilidad y actividad. **FIGURA 20**.

A continuación se describe un procedimiento para la conjugación dirigida al sitio de los ligandos, ilustrado en **la FIGURA 31**. Se prepararon nano-aAPC con conjugación de tiol específica al sitio de los ligandos de segunda generación, incluyendo ligandos basados en los complejos pHLA fusionados a la región bisagra de la Ig. Se utilizaron ligandos en versión murina y humanizada para preparar las nano-aAPC. Las nano-APC se preparan mediante un procedimiento de dos pasos. En primer lugar, se preparan partículas compuestas por PLGA-mPEG y PLGA-PEG-maleimida mediante un procedimiento de nanoprecipitación. Por ejemplo, una mezcla de PLGA-mPEG y PLGA-PEG-maleimida (PLGA-PEG-maleimida % en p/p varía entre 1-55 %) se disuelve en acetonitrilo a una concentración final de 50 mg/ml. Esta solución se inyecta a 5 ml/min utilizando una bomba de jeringa en una solución de PVA (MnPVA = 9 kDa, 0,5 % p/v) bajo agitación. Los saltos de disolvente orgánico:acuoso variaron entre 1:1 y 1:20. Para la preparación de las partículas se pueden utilizar dispositivos de microfluidos, chorros de impacto confinados y mezcladores de vórtice de varias entradas que garantizan una consistencia superior y una distribución de tamaños reducida. Las partículas se purifican mediante filtración de flujo tangencial (TFF) o utilizando filtros centrífugos Amicon. A continuación, las partículas se resuspendieron en tampón de conjugación (HEPES 50 mM, EDTA 10 mM, pH = 6,7). Por último, las nano-aAPC se preparan conjugando una mezcla de ligandos anti-CD28 y KbSIY/HLA a las partículas. La conjugación de los ligandos con las partículas se deja durante toda la noche a temperatura ambiente. Las relaciones de masa de los ligandos: las partículas oscilan entre 1 y 500 µg/mg de partícula. La relación de anti-CD28:Kb/HLA varía entre 0-1. Los ligandos no unidos se eliminan mediante SEC o TFF. Se prepararon partículas con un diámetro medio de 90 nm y una distribución de tamaños entre 50-120 nm. **FIGURA 32**.

Como se muestra en **la FIGURA 22**, las partículas aAPC de PLGA-PEG estimulan la proliferación de células T específicas de antígeno de una manera dependiente de la dosis. Además, como se muestra en **la FIGURA 23**, las aAPC basadas en PLGA-PEG son estables tras la liofilización.

En la **FIGURA 24** se muestra un cultivo de Día 4 de células T 2C con cantidades crecientes de aAPC nano PLGA-PEG cargadas con SIY, mostrando una expansión dependiente de la dosis de células T específicas de antígeno. La **FIGURA 25** muestra grupos de proliferación de células T 1 día después de la estimulación con nano-aAPCs.

5 La **FIGURA 28** muestra nano-aAPC con conjugación de ligandos por tiol en un sitio específico. Las perlas contenían una relación 1:1 de polímeros PEG-COOH y mPEG (lote 72B) o una relación 1:9 de PEG-mal:mPEG (lote 77B). Ambos estaban estables y activos.

10 La **FIGURA 30** muestra la expansión basada en nano aAPC de células T humanas específicas de CMV o MART-1. Los APC basados en Dynal se muestran a modo de comparación. La expansión se muestra en el Día 0, Día 7, Día 14 y Día 21. La tinción de CD8 se muestra en el eje X, y las células T específicas de antígeno se identifican en el eje Y basándose en la tinción del tetrámero péptido-MHC.

La **FIG. 31** ilustra formulaciones ejemplares de nanopartículas, incluyendo la conjugación de los ligandos a las partículas con la química dirigida al sitio de maleimida (A); la caracterización de las partículas por dispersión dinámica de la luz (DLS) (B); y la caracterización del tamaño, la carga y la PDI de un lote representativo (NI26). Las partículas NI26 muestran un pico de distribución de tamaño en torno a 108 nm, una PDI de 0,08 y una carga de -6,7 mV.

15

REIVINDICACIONES

1. Una célula presentadora de antígeno artificial (aAPC) que comprende una nanopartícula polimérica que tiene ligandos polipeptídicos unidos adecuados para activar células T específicas de antígeno, teniendo la nanopartícula un tamaño en el intervalo de 20 a 200 nm, y que comprende:
 - 5 un núcleo de polímero de ácido láctico-co-glicólico (PLGA), y una cubierta hidrofílica formada por polietilenglicol (PEG), en la que la nanopartícula polimérica comprende copolímeros en bloque PLGA-PEG y PLGA-metoxipege (PLGA-mPEG) con la porción de PLGA que tiene pesos moleculares de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 30 kDa y la porción de PEG que tiene peso(s) molecular(es) de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 10 kDa,
 - 10 en la que los copolímeros en bloque PLGA-PEG y PLGA-mPEG están presentes en una relación de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 2:1 en masa; y en la que una parte de los polímeros PLGA-PEG tienen una unión terminal de un ligando polipeptídico;
 - 15 en la que los ligandos polipeptídicos comprenden ligandos péptido-HLA y uno o más de los ligandos anti-CD28 y anti-4-1BB.
2. La aAPC de la reivindicación 1, en la que el núcleo de polímero PLGA se basa en una relación de 20:1 a 1:20 de ácido láctico:ácido glicólico.
3. La aAPC de la reivindicación 1 o 2, en la que la cubierta hidrofílica comprende una mezcla de cadenas de PEG que tienen diferentes pesos moleculares.
- 20 4. La aAPC de la reivindicación 3, en la que los ligandos polipeptídicos están unidos al PEG a través de aminas primarias en los polipéptidos o a través de una cadena lateral de cisteína no apareada.
5. La aAPC de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la aAPC tiene una carga superficial de aproximadamente 0 a -20 mV, y opcionalmente de aproximadamente -5 a aproximadamente -10 mV.
- 25 6. El aAPC de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que tiene menos de aproximadamente 200 ligandos por partícula.
7. La aAPC de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el ligando HLA es dimérico, opcionalmente en la que el HLA comprende una fusión con secuencias de inmunoglobulina y opcionalmente los ligandos HLA comprenden un dominio extracelular de HLA fusionado a una región bisagra de inmunoglobulina, sin secuencias de dominio variable de inmunoglobulina.
- 30 8. Una composición para su uso en la inducción de la formación de células T citotóxicas específicas de antígeno en un paciente, comprendiendo la composición la aAPC de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la composición está formulada opcionalmente para la administración intravenosa, la administración intraarterial, la administración subcutánea, la administración intradérmica, la administración intralinfática o la administración intratumoral.
- 35 9. La composición para su uso de la reivindicación 8, en la que el paciente es un paciente con cáncer.
10. La composición para su uso de la reivindicación 9, en la que el paciente está sometido o ha sido sometido a una terapia con uno o más inhibidores de puntos de control, opcionalmente en la que el paciente está sometido a una terapia de células T adoptivas.

FIGURA 1

Secuencias VH1 anti-CD28

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGGCCCTGGTGAAGCCCTCAGAGACCCTGTCCCTCACTTGTACTGTCTCTGGGTTTTTCATTAAAGCGACTATGGTG
E V K L Q Q S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G F S L S D Y G
10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
TTCAATTGGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGCACTGGAGTGGCTGGGAGTAAATATGGGCTGGTGGAGCCACGAATTATAATTCGGCTCTCATGTCCAGAAA
V H W V R Q A P G K G L E W L G V I W A G G G T N Y N S A L M S R K
40      50      60      70      80      90      100      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
GACCATCAGCAAGACACACTCCAGAGAGCCCAAGTTTCTTAAATAATGAACAGTCTGACAGCTGCTGACACAGCCGGTGTATTACTGTGCCAGAGATAAGGGA
T I S K D N S K S Q V F L K M N S L T A A D T A V Y Y C A R D K G
70      80      90      100      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200      210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
TACTCCTATTACTATTCTATGGACTACTGGGGCCCAAGCCCTGGTCACCCGTCTCCTCA
Y S Y Y Y S M D Y W G Q G T L V T V S S
100 A B C D
110

```

Definiciones de CDR y numeración de secuencias de proteínas según Kabat. Las secuencias de nucleótidos y proteínas de CDR están resaltadas en rojo

FIGURA 2

Secuencias VH2 anti-CD28

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGGCCCTGGTGAAGCCCTCAGAGACCCCTGTCCTCCTCACTTGTACTGTCTCTCTGGGTTTTCATTAAAGCGACTATGGTG
E V K L Q Q S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G F S L S D Y G
10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
TTCATTGGGTTCCGCGAGCTCCAGGAAAGGACTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGCTGGTGGAGGCACGAATTATAATTCGGCTCTCATGTCCAGAAA
V H W V R Q A P G K G L E W L G V I W A G G T N Y N S A L M S R K
40      50      60      70      80      90     100
GACCATCAGCAAGACAACCTCCAGAGAGCCCAAGTTTCCTTAAATAATGAGCAGTGTGACAGCTGCTGACACAGCCGCGTGTATTACTGTGCCAGAGACATAAGGGA
T I S K D N S K S Q V S L K M S S V T A A D T A V Y Y C A R D K G
70      80      90     100
TACTCCCTATTACTATTCTATGGACTACTGGGGCCCAAGGCACCCCTGGTCACCCGTCCTCTCA
Y S Y Y Y S M D Y W G Q G T L V T V S S
100 A B C D
110
110      120      130      140      150      160      170      180      190     200
TTCATTGGGTTCCGCGAGCTCCAGGAAAGGACTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGCTGGTGGAGGCACGAATTATAATTCGGCTCTCATGTCCAGAAA
V H W V R Q A P G K G L E W L G V I W A G G T N Y N S A L M S R K
40      50      60      70      80      90     100
GACCATCAGCAAGACAACCTCCAGAGAGCCCAAGTTTCCTTAAATAATGAGCAGTGTGACAGCTGCTGACACAGCCGCGTGTATTACTGTGCCAGAGACATAAGGGA
T I S K D N S K S Q V S L K M S S V T A A D T A V Y Y C A R D K G
70      80      90     100
TACTCCCTATTACTATTCTATGGACTACTGGGGCCCAAGGCACCCCTGGTCACCCGTCCTCTCA
Y S Y Y Y S M D Y W G Q G T L V T V S S
100 A B C D
110
110      120      130      140      150      160      170      180      190     200
TTCATTGGGTTCCGCGAGCTCCAGGAAAGGACTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGCTGGTGGAGGCACGAATTATAATTCGGCTCTCATGTCCAGAAA
V H W V R Q A P G K G L E W L G V I W A G G T N Y N S A L M S R K
40      50      60      70      80      90     100
GACCATCAGCAAGACAACCTCCAGAGAGCCCAAGTTTCCTTAAATAATGAGCAGTGTGACAGCTGCTGACACAGCCGCGTGTATTACTGTGCCAGAGACATAAGGGA
T I S K D N S K S Q V S L K M S S V T A A D T A V Y Y C A R D K G
70      80      90     100
TACTCCCTATTACTATTCTATGGACTACTGGGGCCCAAGGCACCCCTGGTCACCCGTCCTCTCA
Y S Y Y Y S M D Y W G Q G T L V T V S S
100 A B C D
110
```

Definiciones de CDR y numeración de secuencias de proteínas según Kabat. Las secuencias de nucleótidos y proteínas de CDR están resaltadas en rojo

FIGURA 3

Secuencias VH3 anti-CD28

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGGCCCTGGTGAAGCCCTCAGAGACCCCTGTCCTCAGTGTCTCTCTGGGTTTTCATTAAAGCGACTATGGTG
E V K L Q Q S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G F S L S D Y G
10      20      30
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TTCATTGGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGGACTGGAGTGGCTGGGCTGGTGGAGCAATTAATTCGGCTCTCATGTCCAGAGT
V H W V R Q A P G K G L E W L G V I W A G G T N Y N S A L M S R V
40      50      60
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GACCATCAGCAAGACAACTCCAAGAGCCCAAGTTTCCTTAAACTGAGCAGTGTGACAGCTGCTGACACACACGCCCGTGTATTACTGTGCCAGAGATAAGGGA
T I S K D N S K S Q V S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R D K G
70      80      90
310     320     330     340     350     360
TACTCCTATTACTATTCTATGGACTACTGGGGCCCAAGGCACCCCTGGTCACCCGTCTCTCA
Y S Y Y Y S M D Y W G Q G T L V T V S S
100 A B C D
110

```

Definiciones de CDR y numeración de secuencias de proteínas según Kabat. Las secuencias de nucleótidos y proteínas de CDR están resaltadas en rojo.

Secuencias VK1 anti-CD28

Definiciones de CDR y numeración de secuencias de proteínas según Kabat. Las secuencias de nucleótidos y proteínas de CDR están resaltadas en rojo.

FIGURA 5

Secuencias VK2 anti-CD28

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGATTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGGAGAGAGCCACCATCAACTGCAGAGCCAGTGAGAGTGTGATTAATTATGTCA
D I E L T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C R A S E S V E Y Y V
10
110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
CAAGTTTAAATGCAGTGGTACCAAGAGCCAGAGCCAGGACAGCCACCCAACTCCCTCATCTTTTGGCTGCAATCCCAACGTAGAAATCTGGGGTCCCTGACAGSGTTTAG
T S L M Q W Y Q Q K P G Q P P K L L I F A A S N V E S G V P D R F S
30
210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
TGGCAGTGGGTCTGGGACAAACTTCACCCCTCACCCTCACCCTCTCTCTGCGAGGCCGAGGATGTTGCAATGTATTTCTGTCTCAGCAAGTAGGAAGGTTCCCTAC
G S G S G T N F T L T I S S L Q A E D V A M Y F C Q Q S R K V P Y
70      80      90
310      320      330
ACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGGTGGAAATAAAA
T F G G G T K V E I K
110

```

Definiciones de CDR y numeración de secuencias de proteínas según Kabat. Las secuencias de nucleótidos y proteínas de CDR están resaltadas en rojo.

FIGURA 6

Secuencias VK3 anti-CD28

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGATTCTTTGGCTGTCTCTACGGGAGAGAGAGCCACCATCAACTGCAGAGCCAGTGAGAGTGTTCATATATGTCA
D I E L T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C R A S E S V E Y Y V
10
110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
CAAGTTTAAATGCAGTGGTACCGAGCAGAGCCAGGACAGCCACCAAACTCCTCATCTTTGCTGCAATCCAAACGTAAGATCTGGGGTCCCTGACAGGTTTAG
T S L M Q W Y Q K P G Q P K L L I F A A S N V E S G V P D R F S
30      40      50      60
210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCCTCACCATCTCTCTCTCGAGCCGAGGATGTTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAGTAGGAAGGTTCCITAC
G S G S G T D F T L T I S S L Q A E D V A M Y F C Q Q S R K V P Y
70      80      90
310      320      330
ACGTTCCGAGGGGGGACCAAGGTGGAATAAAA
T F G G G T K V E I K
110

```

Definiciones de CDR y numeración de secuencias de proteínas según Kabat. Las secuencias de nucleótidos y proteínas de CDR están resaltadas en rojo.

Pesada Constante Modificada:

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCCTCCCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCC									
A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F									
120	130	133	140						
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
CCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCCAGCGGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGCTACAGTCCCTCAGGACICTACTCCCTCAGCAG									
P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S									
150	154	156	157	162	169	171	180	182	
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAACCTACACCTGCAATGTAGATCACAAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGTTGAGTCC									
V V T V P S S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S									
190	200	203	205	210	220	223	226		
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
AAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCAGCACCTGAGTTCGAGGGGGGACCATCAGTCTTCCGTTCCTCCCGCCAAACCCCAAGGACACTCTCATGATCT									
K Y G P P C P C P A P E F E G G P S V F L F P P K P K D T L M I									
220	232	235	237	239	240	250	260		
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
CCCGGACCCCTGAGGTACGTCGTGGTGGACGTGAGCCAGGAGACCCCGAGGTCCAGTTCACACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATATGTC									
S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A									
270	280	290	292	295	296	299	300		

510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
CAAGACAAGCCCGGGAGGAGCGATTCAACAGCACGTACCGTGTGTACGGCTCTCACCGCTCTCCACCGAGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAG									
K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K	310	314 317	320			330			

610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
TGCAAGGTCTCCAAACAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCAT									
C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P	340	350	355 257	360 361 363			370		

710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
CCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGACCTGGTCAAGGCTTCTACCCCGACACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC									
S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P P	378 381	390	400	402 405	408 410 411 414				

810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
GGAGAACAACACAGACCACCGCTCCCGTGGACTCCGACCGGCTCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGG									
E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G	420	428 430 433	440						450

910	920	930	940	950	960	970	980
AATGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACAGAAGAGCCCTCCTCTCTCTGGTAAATGA							
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L C L S L G K *	460	460	470				

Numeración de secuencias de proteínas según Kabat. Las mutaciones están resaltadas en rojo.

FIGURA 8

Ligera κ Constante:

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTGTGCTGCTGAAATAACTTCTATC
R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y
110      120      130      140
CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATACGCCCTCCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGGACAGCACCTACAG
P R E A K V Q W K V D M A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S
150      160      170      180      190      200
CCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCCAAGTCAACCCATCAGGGCCTGAGCTGCCCGTCACAAAG
L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K
210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG
S F N R G E C ,
310      320
200

```

Numeración de secuencias de proteínas según Kabat.

FIGURA 9

Potencial variante humanizada sin unión al antígeno

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCCAGGACCTGGCTGGTGAAGCCCTCAGAGACCCCTGTCCTCTCTGGGTTTACATTACGCGACTATGGTG
E V K L Q Q S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G F T F S D Y G
10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
TTTCATTGGATTCCGCCAGCCTCCAGGAAGGCACTGGAGTGGATCGGAGTAATATGGGCTGGTGGAGCCACGCAATTATATTCGGCTCTCATGTCCAGAGT
V H W I R Q P P G K G L E W I G V I W A G G G T N Y N S A L M S R V
10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GACCATCAGCGTGGACACCTCCAGAACCAATTTCTTAAACTGAGCAGTGTGACAGCTGTGACACAGCCGCTGTATTACTGTGCCAGAGATAAGGGA
T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R O K G
10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
TACTCCGCTGCCGCTTCTATGGACTACTGGGCCAAGCCACCTGGTCACCCGCTCTCCTCA
Y S A A A S M O Y W G Q G T L V T V S S
100 A B C D

```

Definiciones de CDR y numeración de secuencias de proteínas según Kabat. Las secuencias de nucleótidos y proteínas de CDR están resaltadas en rojo.

FIGURA 10

Gln	Val	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Gly	Ser	Gly	Ser	His	Ser	Met	Arg	Tyr	1	5	10	15
Phe	Phe	Thr	Ser	Val	Ser	Arg	Pro	Gly	Arg	Gly	Glu	Pro	Arg	Phe	Ile	20	25	30	
Ala	Val	Gly	Tyr	Val	Asp	Asp	Thr	Gln	Phe	Val	Arg	Phe	Asp	Ser	Asp	35	40	45	
Ala	Ala	Ser	Gln	Arg	Met	Glu	Pro	Arg	Ala	Pro	Trp	Ile	Glu	Gln	Glu	50	55	60	
Gly	Pro	Glu	Tyr	Trp	Asp	Gly	Glu	Thr	Arg	Lys	Val	Lys	Ala	His	Ser	65	70	75	80
Gln	Thr	His	Arg	Val	Asp	Leu	Gly	Thr	Leu	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Gln	85	90	95	
Ser	Glu	Ala	Gly	Ser	His	Thr	Val	Gln	Arg	Met	Tyr	Gly	Cys	Asp	Val	100	105	110	
Gly	Ser	Asp	Trp	Arg	Phe	Leu	Arg	Gly	Tyr	His	Gln	Tyr	Ala	Tyr	Asp	115	120	125	
Gly	Lys	Asp	Tyr	Ile	Ala	Leu	Lys	Glu	Asp	Leu	Arg	Ser	Trp	Thr	Ala	130	135	140	
Ala	Asp	Met	Ala	Ala	Gln	Thr	Thr	Lys	His	Lys	Trp	Glu	Ala	Ala	His	145	150	155	160
Val	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg	Ala	Tyr	Leu	Glu	Gly	Thr	Cys	Val	Glu	Trp	165	170	175	
Leu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Glu	Thr	Leu	Gln	Arg	Thr	Asp	180	185	190	
Ala	Pro	Lys	Thr	His	Met	Thr	His	His	Ala	Val	Ser	Asp	His	Glu	Ala	195	200	205	
Thr	Leu	Arg	Cys	Trp	Ala	Leu	Ser	Phe	Tyr	Pro	Ala	Glu	Ile	Thr	Leu	210	215	220	

FIGURA 10, continuación

Thr	Trp	Gln	Arg	Asp	Gly	Glu	Asp	Gln	Thr	Gln	Asp	Thr	Glu	Leu	Val	225	230	235	240
Glu	Thr	Arg	Pro	Ala	Gly	Asp	Gly	Thr	Phe	Gln	Lys	Trp	Ala	Ala	Val	245	250	255	
Val	Val	Pro	Ser	Gly	Gln	Glu	Gln	Arg	Tyr	Thr	Cys	His	Val	Gln	His	260	265	270	
Glu	Gly	Leu	Pro	Lys	Pro	Leu	Thr	Trp	Ala	Arg	Glu	Val	Ser	Glu	Val	275	280	285	
Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	290	295	300	
Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	Gly	Val	305	310	315	320
His	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Val	325	330	335	
Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	340	345	350	
Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	355	360	365	
Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	370	375	380	
Lys	Gly	Tyr	Ser	Ala	Ala	Ala	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	385	390	395	400
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	405	410	415	
Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	420	425	430	
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn				

FIGURA 10, continuación

435	440	445
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln 450 455 460		
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser 465 470 475 480		
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser 485 490 495		
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys 500 505 510		
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu 515 520 525		
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu 530 535 540		
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln 545 550 555 560		
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys 565 570 575		
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu 580 585 590		
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys 595 600 605		
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys 610 615 620		
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser 625 630 635 640		
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys 645 650 655		

FIGURA 10, continuación

Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
			660					665					670		
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
		675					680					685			
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
	690					695					700				
Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
705					710					715					720
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Cys	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys			
				725					730						

FIGURA 11

Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	1	5	10	15
Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Glu	Tyr	Tyr	20	25	30	
Val	Thr	Ser	Leu	Met	Gln	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	35	40	45	
Lys	Leu	Leu	Ile	Phe	Ala	Ala	Ser	Asn	Val	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	50	55	60	
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	65	70	75	80
Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Met	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Arg	85	90	95	
Lys	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	100	105	110	
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	115	120	125	
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	130	135	140	
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	145	150	155	160
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	165	170	175	
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	180	185	190	
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	195	200	205	
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							210	215		

FIGURA 12

Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Asp	Tyr	20	25	30	
Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	35	40	45	
Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Met	50	55	60	
Ser	Arg	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	65	70	75	80
Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	85	90	95	
Arg	Asp	Lys	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	100	105	110	
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	115	120	125	
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	130	135	140	
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	145	150	155	160
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	165	170	175	
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	180	185	190	
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	195	200	205	
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	210	215	220	

FIGURA 12, continuación

Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	225	230	235	240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	245	250	255	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	260	265	270	
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	275	280	285	
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	290	295	300	
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	305	310	315	320
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	325	330	335	
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	340	345	350	
Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	355	360	365	
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	370	375	380	
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	385	390	395	400
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	405	410	415	
Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	420	425	430	
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Cys	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys		435	440	445	

FIGURA 13

Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Asp	Tyr	20	25	30	
Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	35	40	45	
Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Met	50	55	60	
Ser	Arg	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Ser	Leu	65	70	75	80
Lys	Met	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	85	90	95	
Arg	Asp	Lys	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	100	105	110	
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	115	120	125	
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	130	135	140	
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	145	150	155	160
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	165	170	175	
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	180	185	190	
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	195	200	205	

FIGURA 13, continuación

Pro 210	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp 215	Lys	Arg	Val	Glu	Ser 220	Lys	Tyr	Gly	Pro
Pro 225	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala 230	Pro	Glu	Phe	Glu 235	Gly	Gly	Pro	Ser	Val 240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro 245	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr 250	Leu	Met	Ile	Ser	Arg 255	Thr
Pro	Glu	Val	Thr 260	Cys	Val	Val	Val	Asp 265	Val	Ser	Gln	Glu 270	Asp	Pro	Glu
Val	Gln	Phe 275	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp 280	Gly	Val	Glu	Val	His 285	Asn	Ala	Lys
Thr 290	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 295	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr 300	Arg	Val	Val	Ser
Val 305	Leu	Thr	Val	Leu	His 310	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn 315	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys 320
Cys	Lys	Val	Ser	Asn 325	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser 330	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr 335	Ile
Ser	Lys	Ala	Lys 340	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu 345	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr 350	Leu	Pro
Pro	Ser	Gln 355	Glu	Glu	Met	Thr	Lys 360	Asn	Gln	Val	Ser	Leu 365	Thr	Cys	Leu
Val	Lys 370	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser 375	Asp	Ile	Ala	Val	Glu 380	Trp	Glu	Ser	Asn
Gly 385	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn 390	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro 395	Pro	Val	Leu	Asp	Ser 400
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe 405	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu 410	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg

FIGURA 13, continuación

Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
			420					425					430		
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Cys	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	
		435					440					445			

FIGURA 14

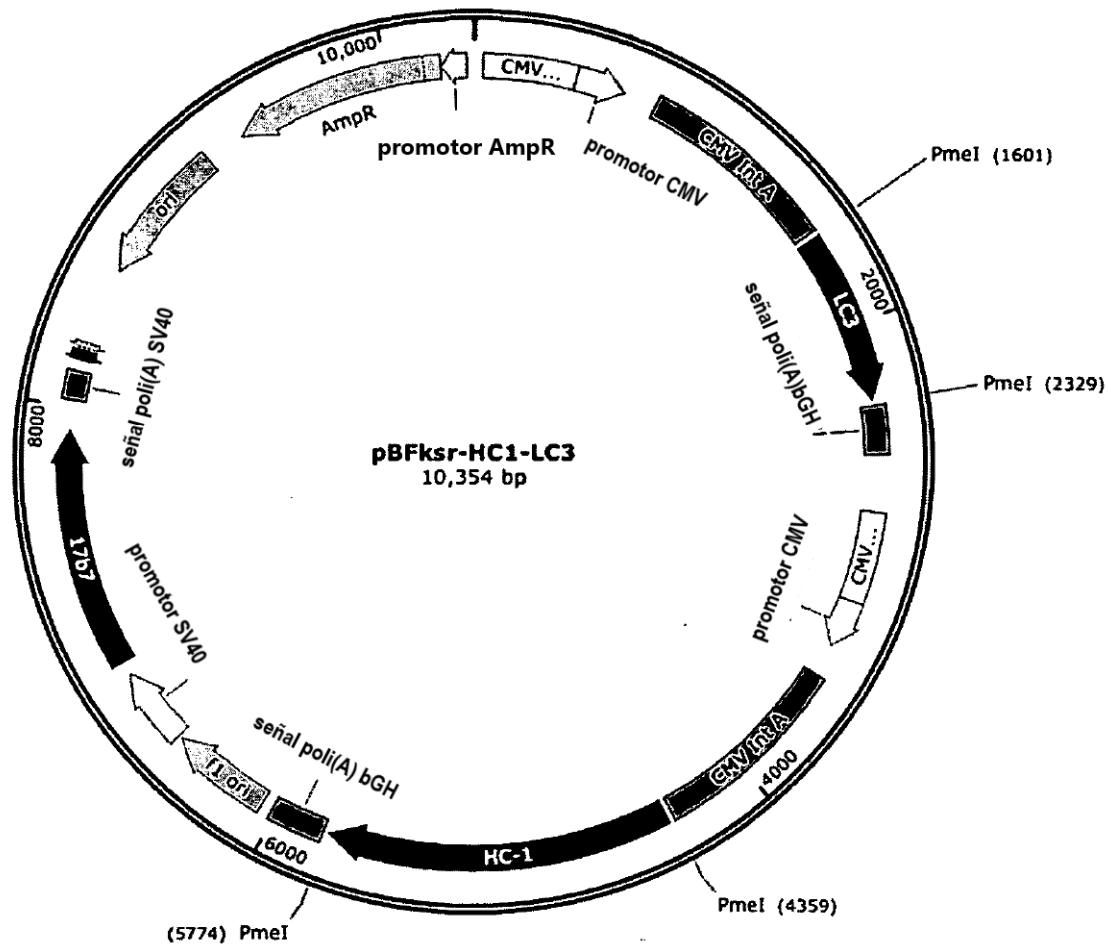


FIGURA 15

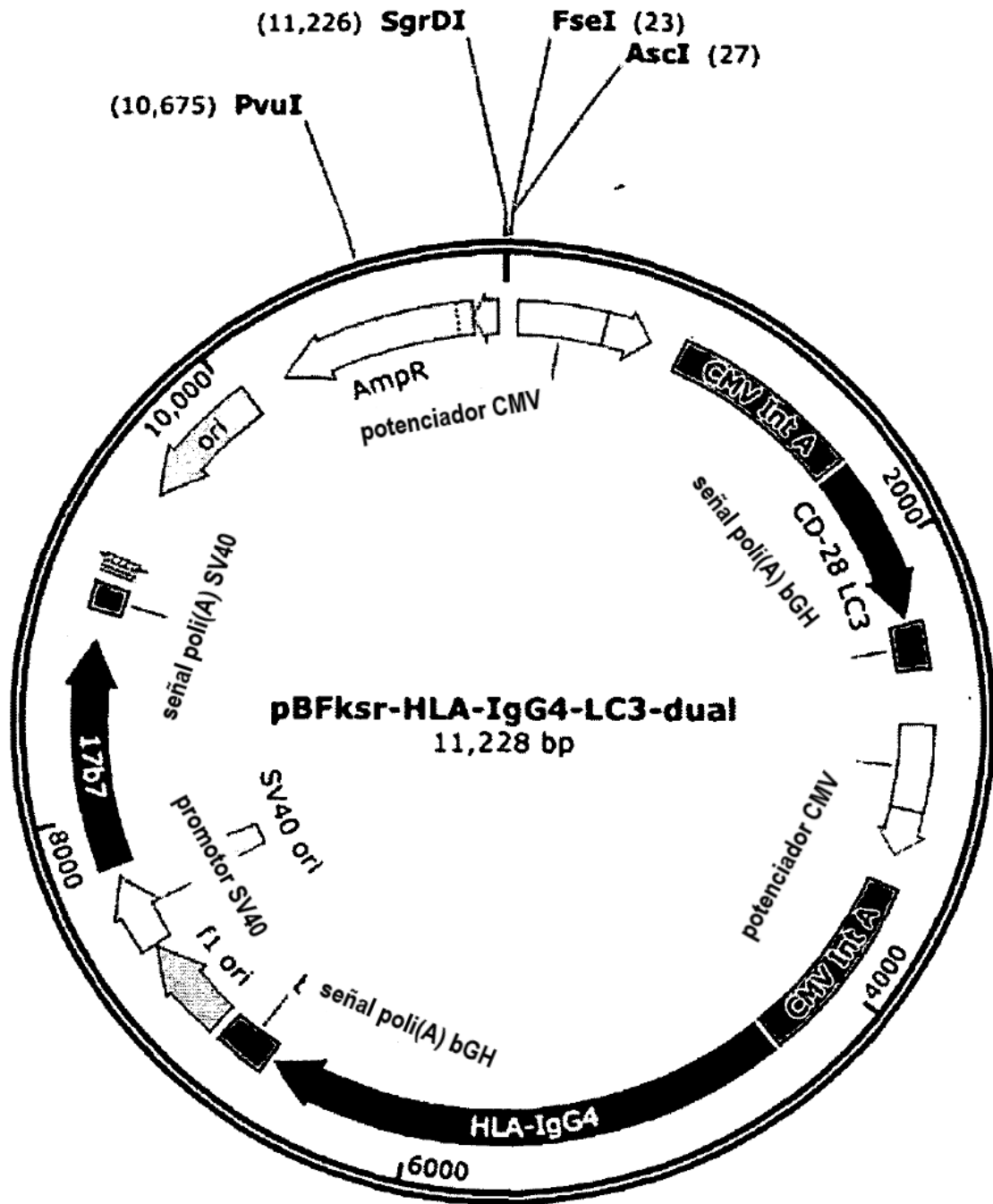


FIGURA 16

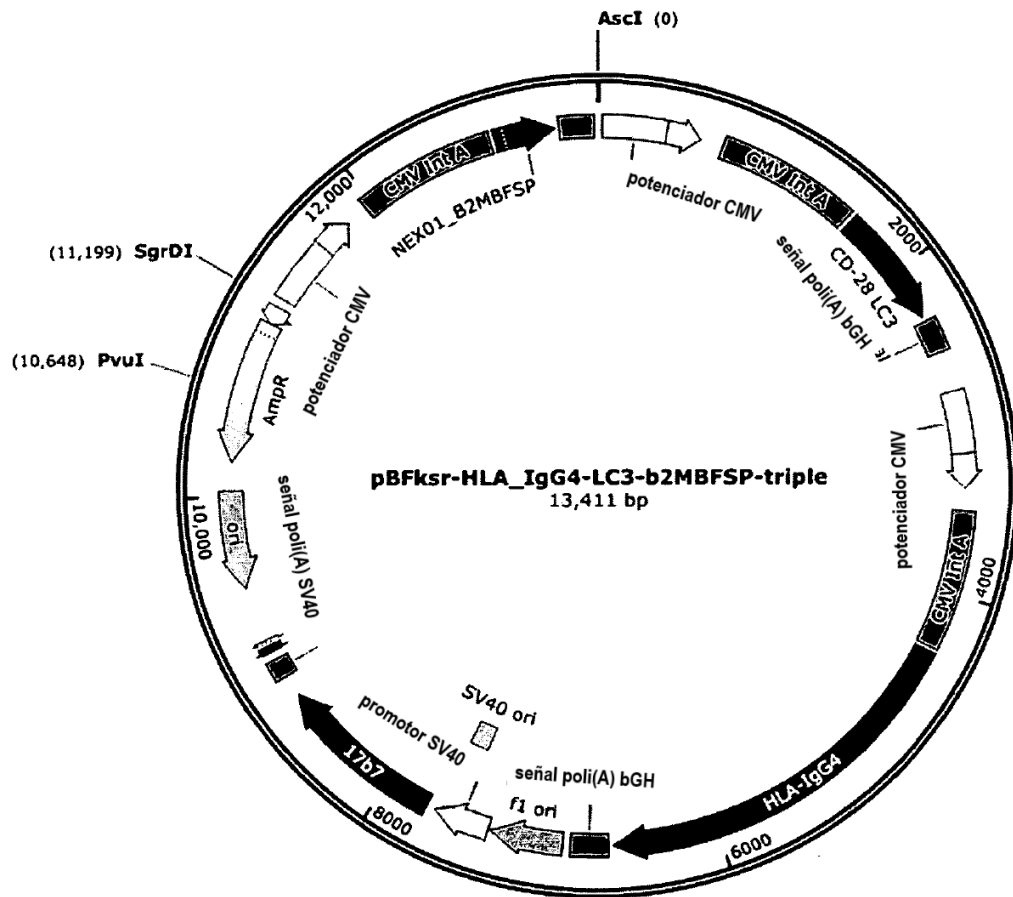


FIGURA 17

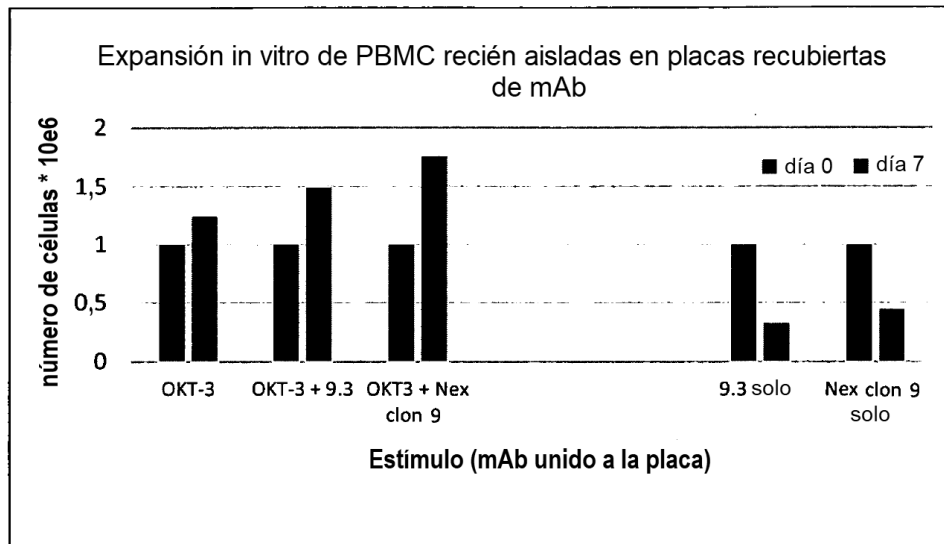


FIGURA 18

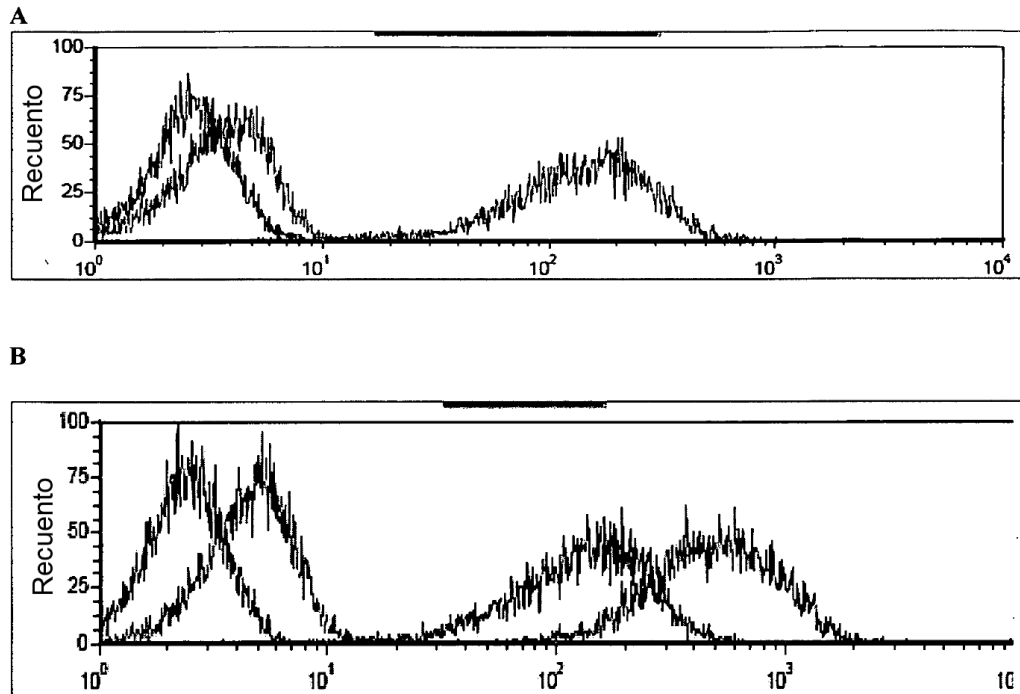


FIGURA 19

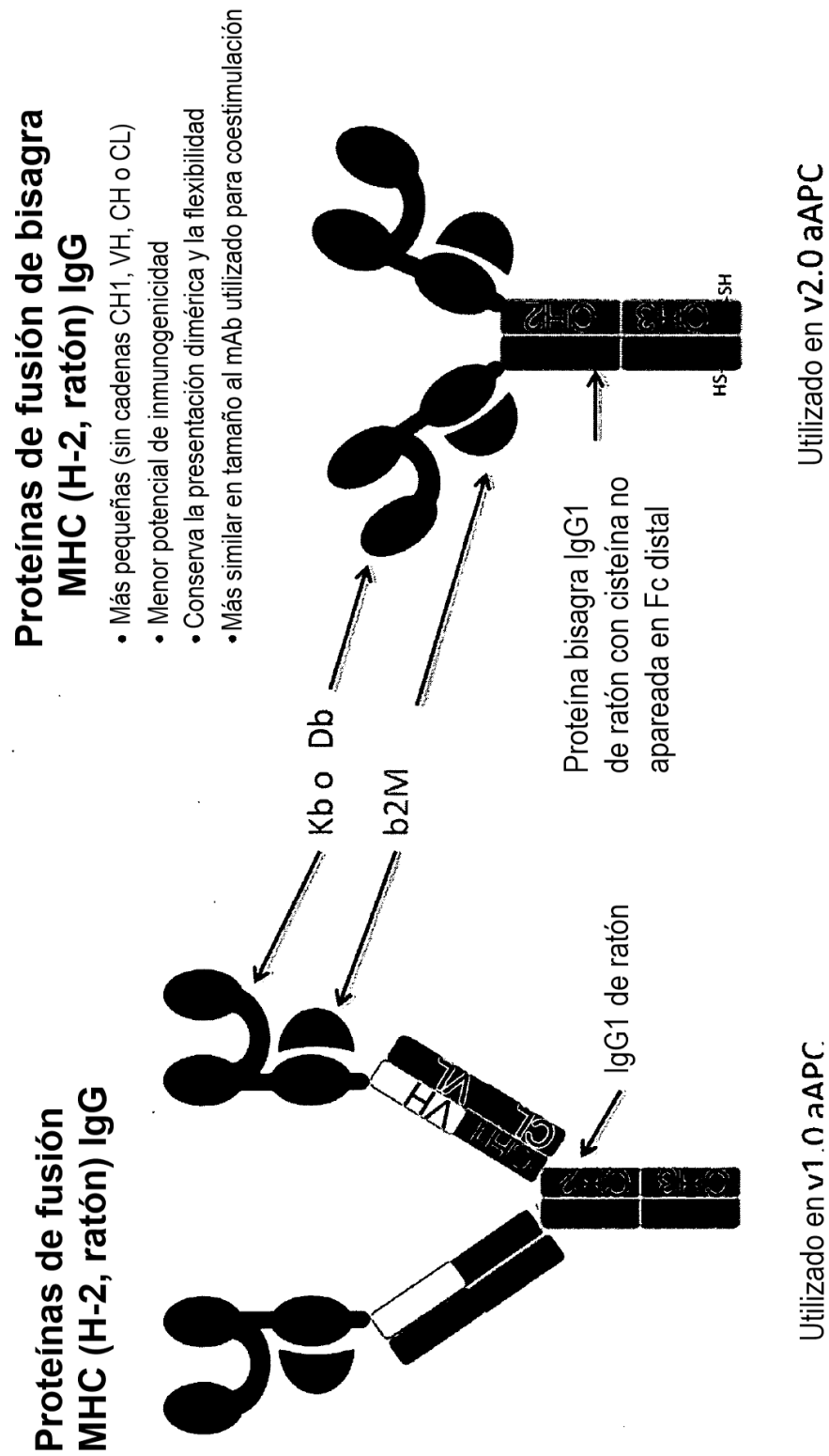
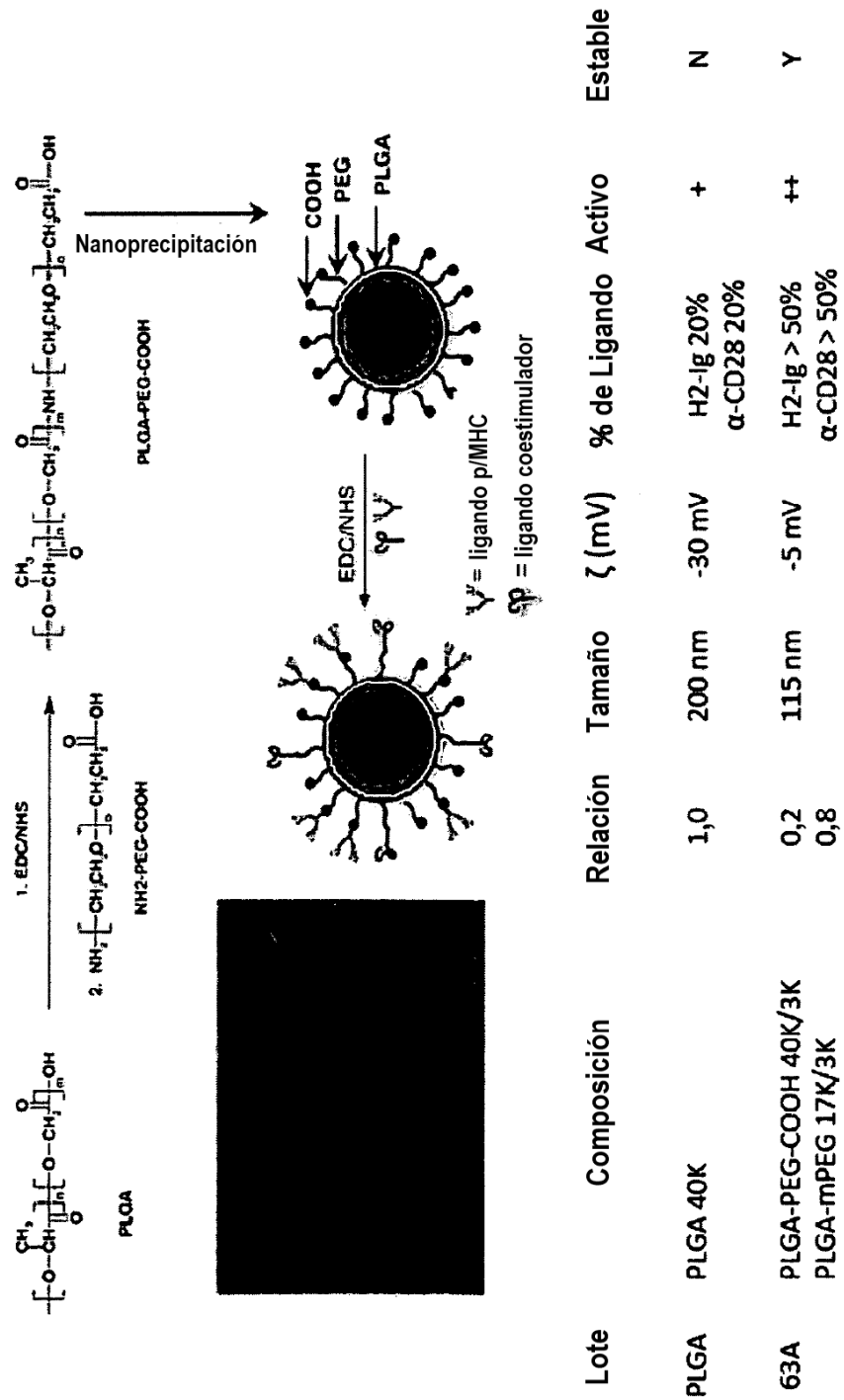


FIGURA 20



- PLGA-PEG es biocompatible y reconocido por la FDA como seguro para uso en humanos
- PEG proporciona capa "sigilosa" para prevenir eliminación de la circulación por células fagocíticas para mejor PK/PD
- El nanotamaño (<200 nm) permite la distribución a tejidos diana (nodos linfáticos, bazo, sitios tumorales)
- La composición del polímero proporciona una semivida de eliminación prolongada y una dosificación infrecuente

FIGURA 21

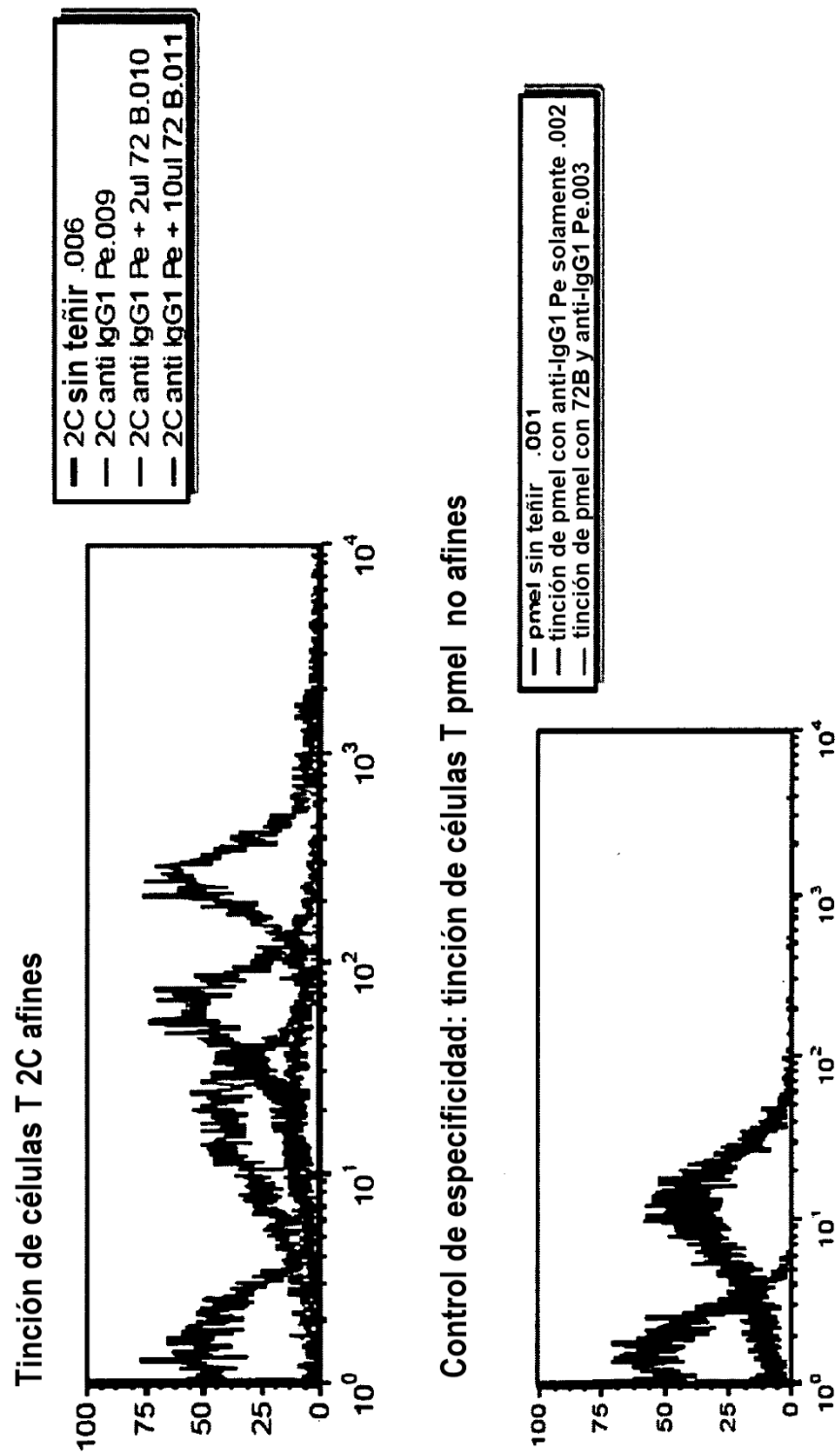
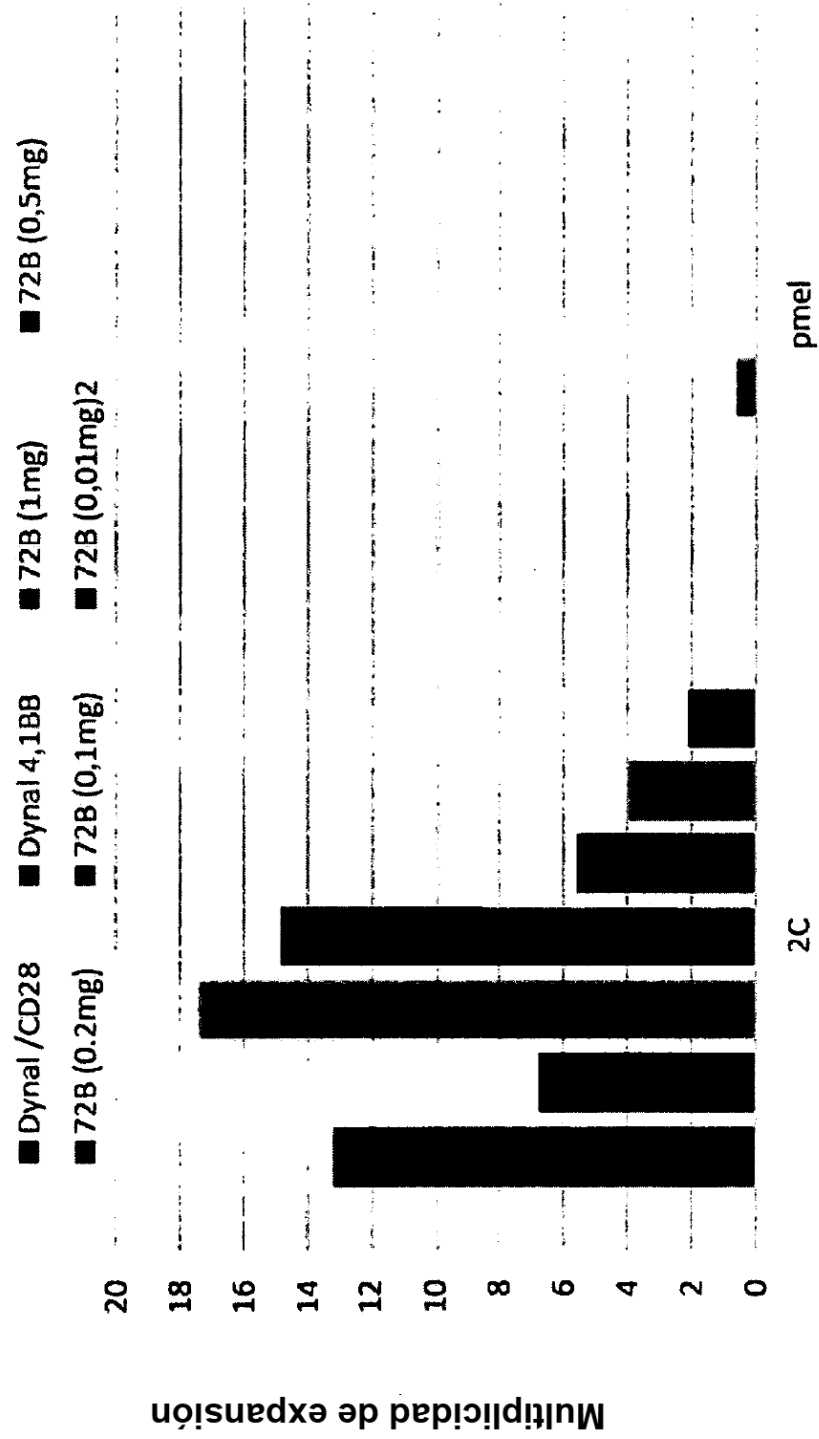


FIGURA 22



Lote 72B nano-aAPC en dosis indicada por 10e6 células 2CT (día 5)

FIGURA 23

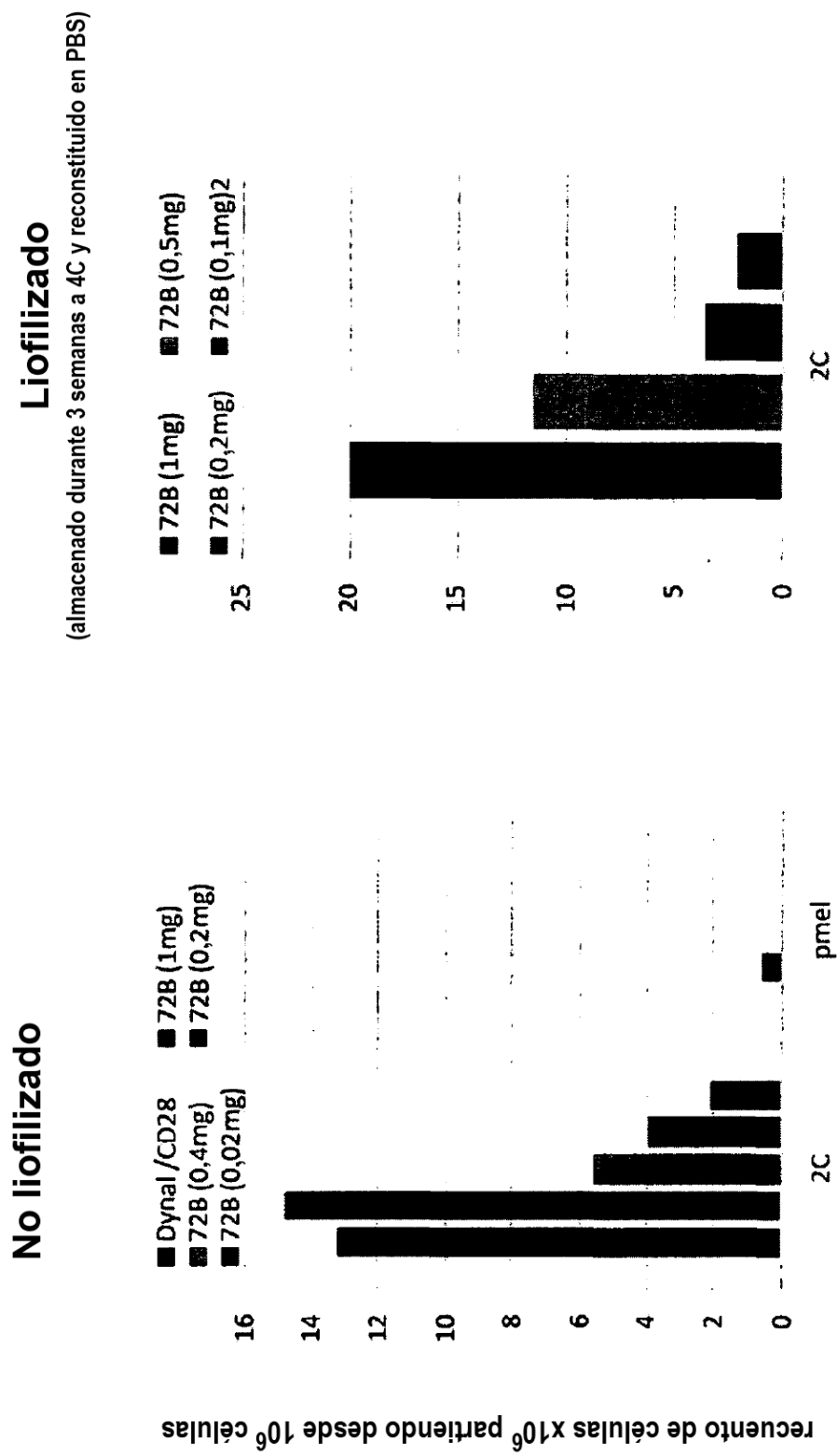
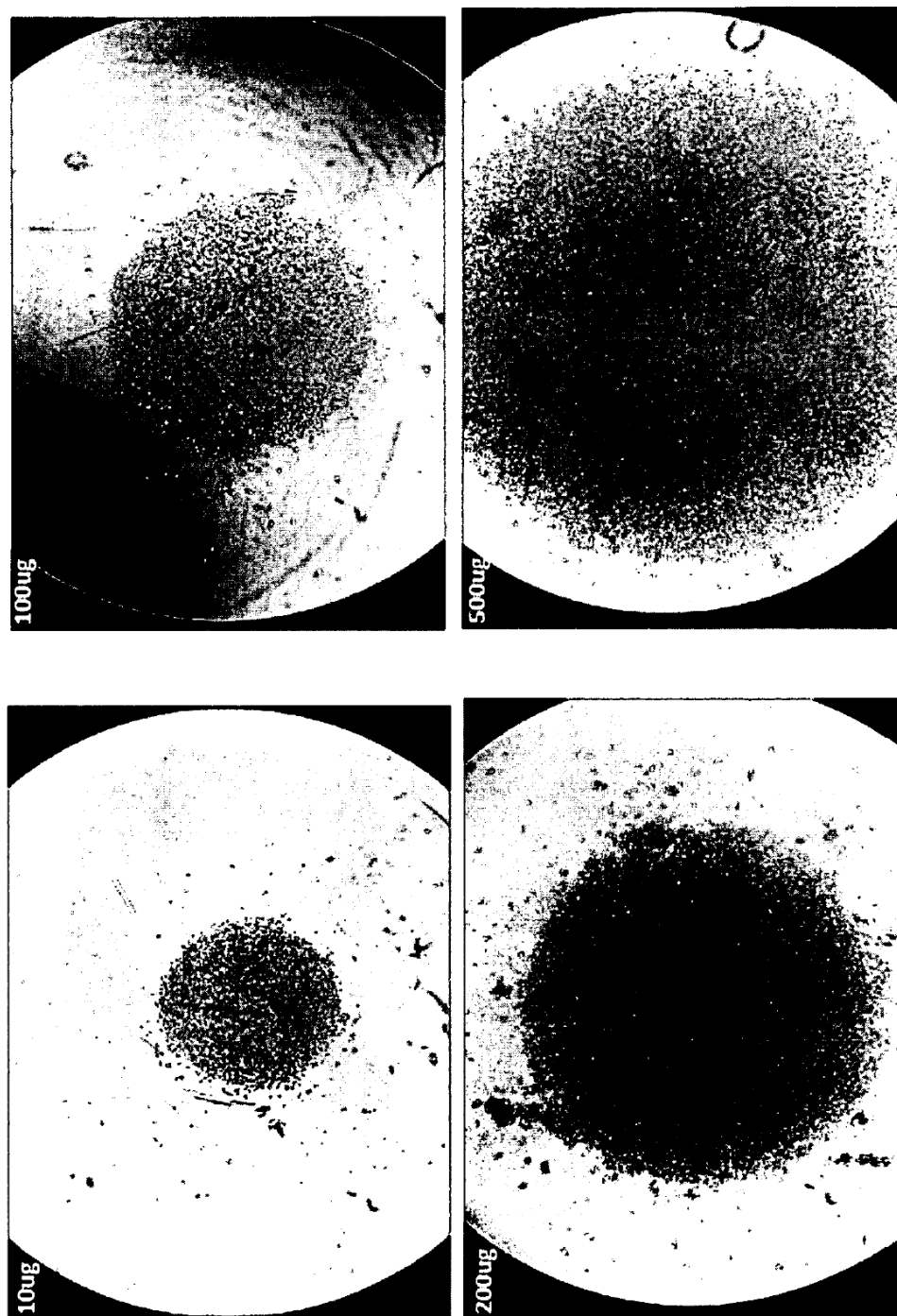


FIGURA 24



Nota: ug de nanopartículas AIM101 basadas en PLG-PEG añadidas por millón de células T 2C en el día 0 de cultivo

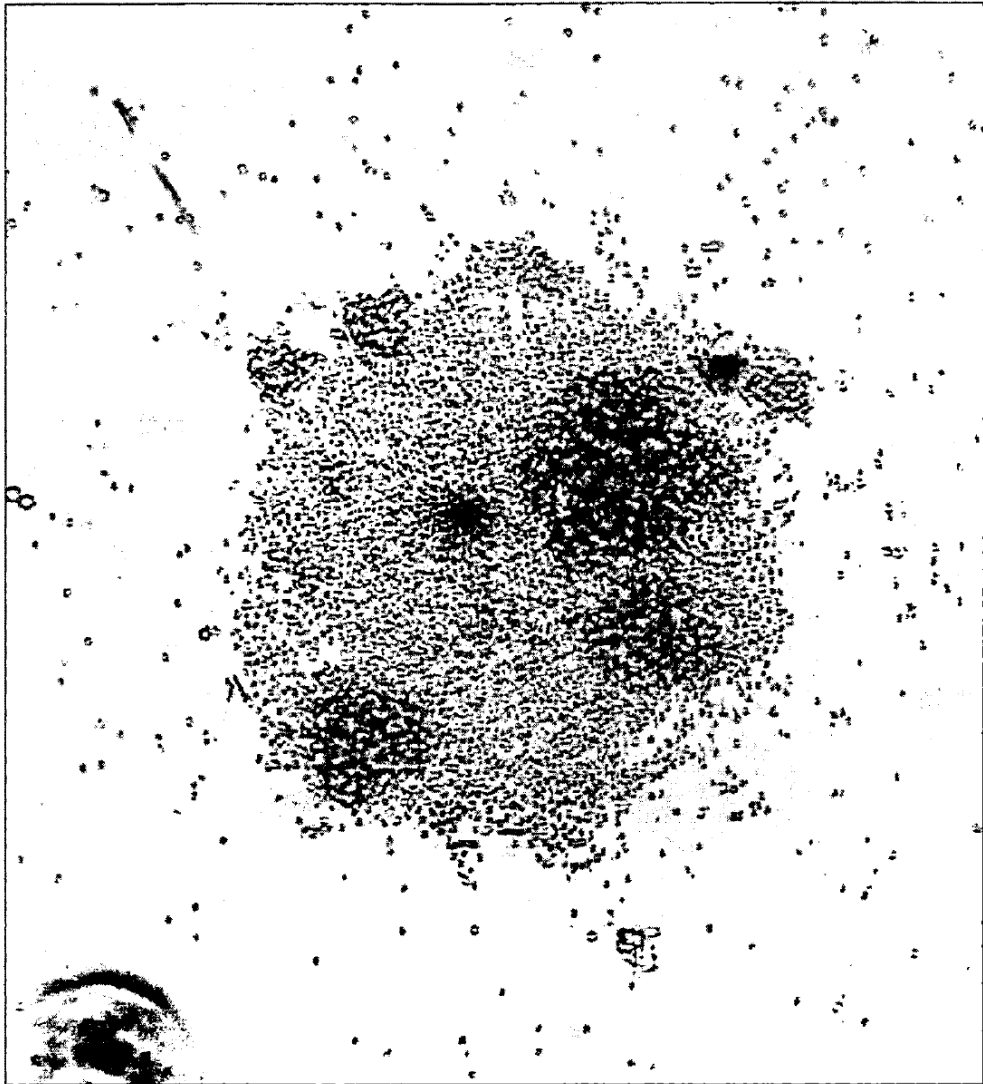


FIGURA 25

FIGURA 26

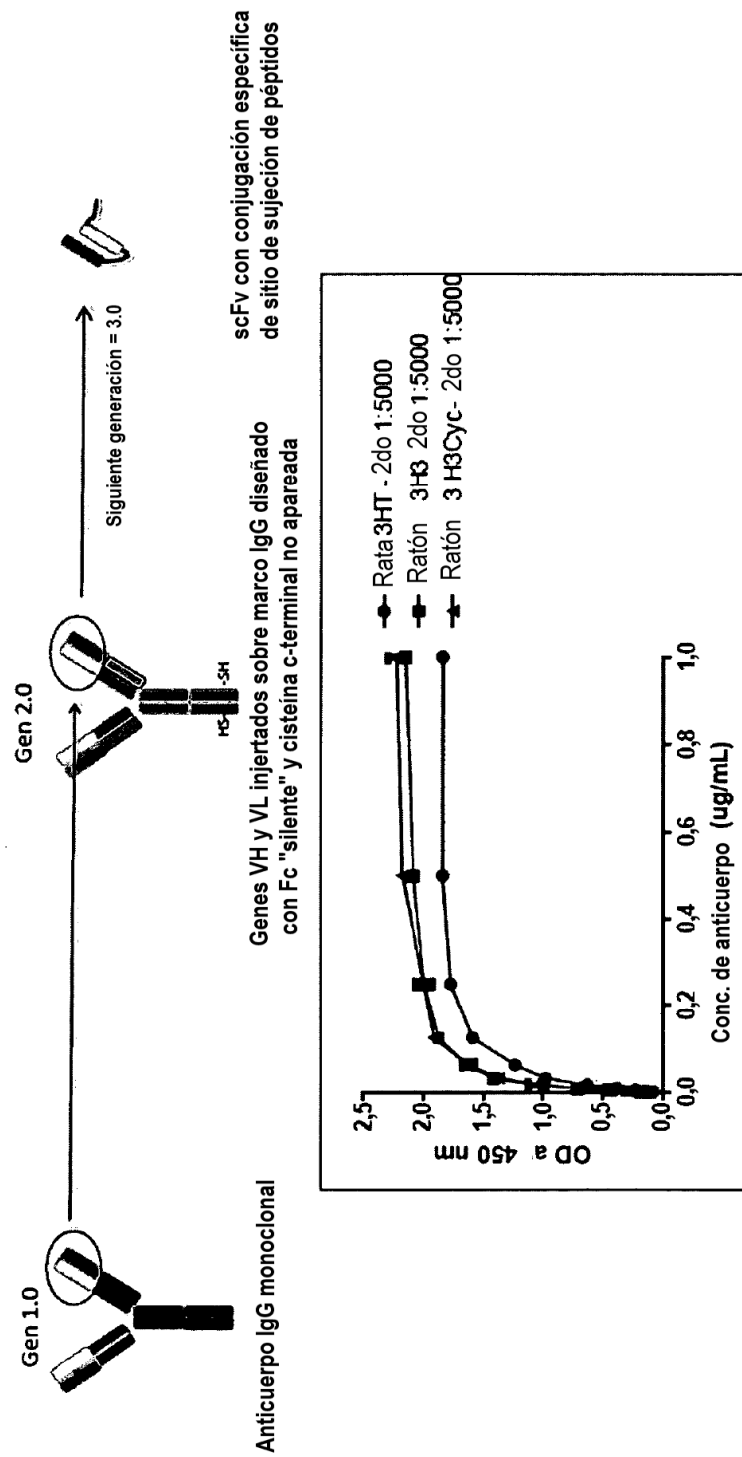


FIGURA 27

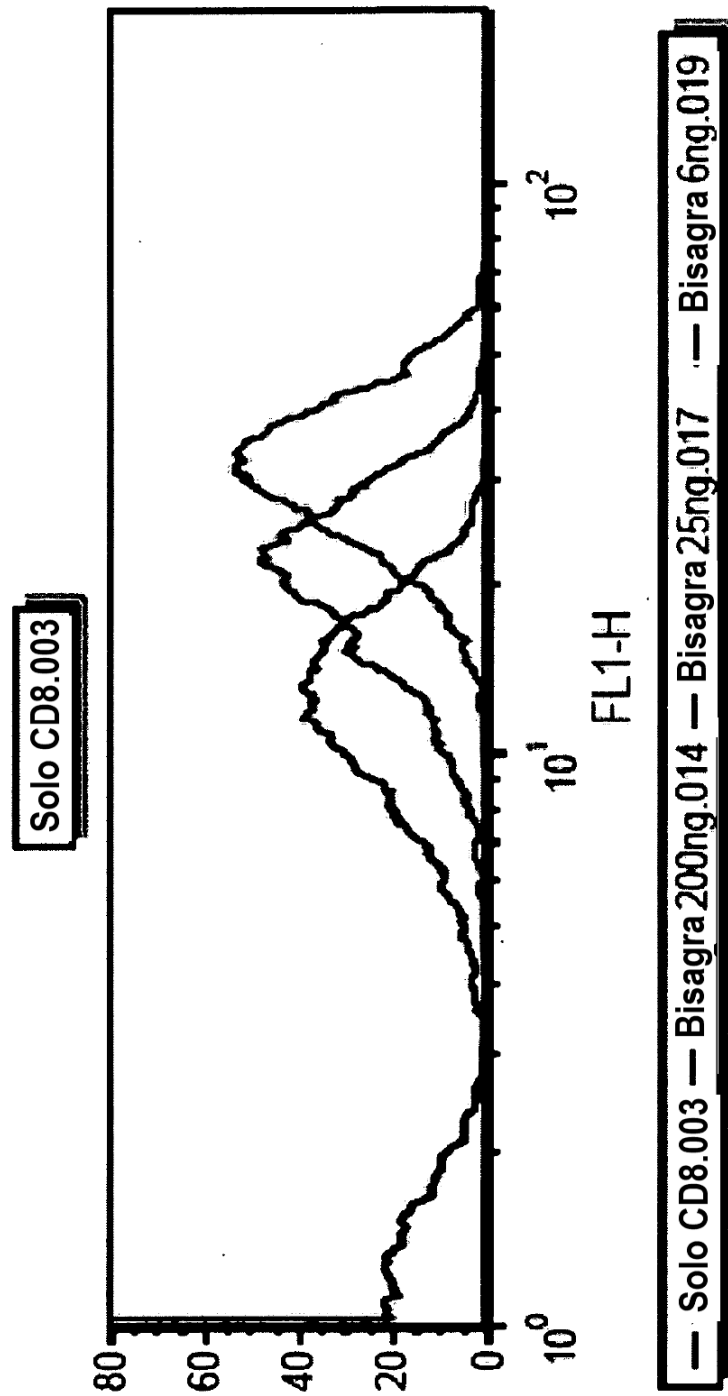


FIGURA 28

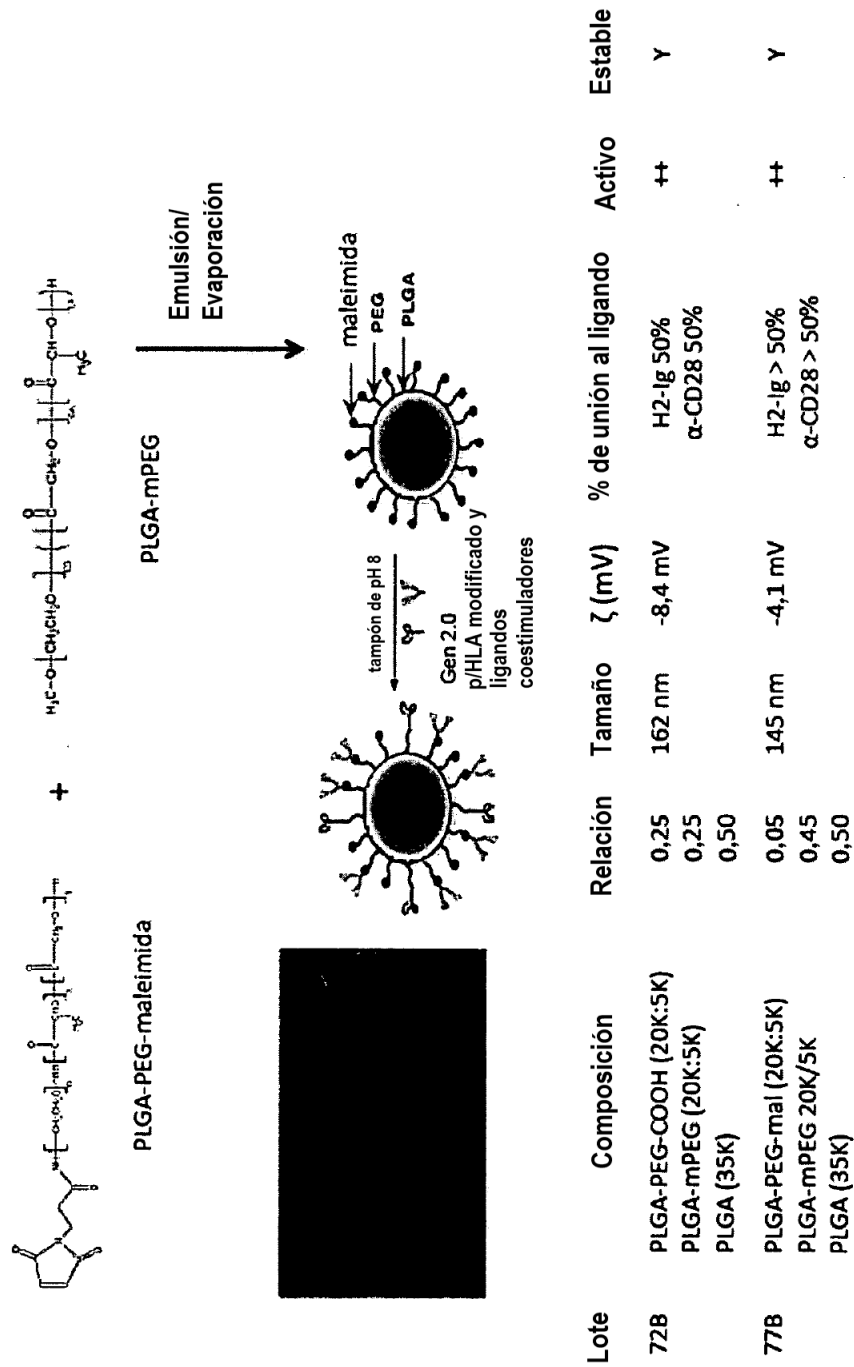


FIGURA 29

Expansión de células T específicas de antígeno

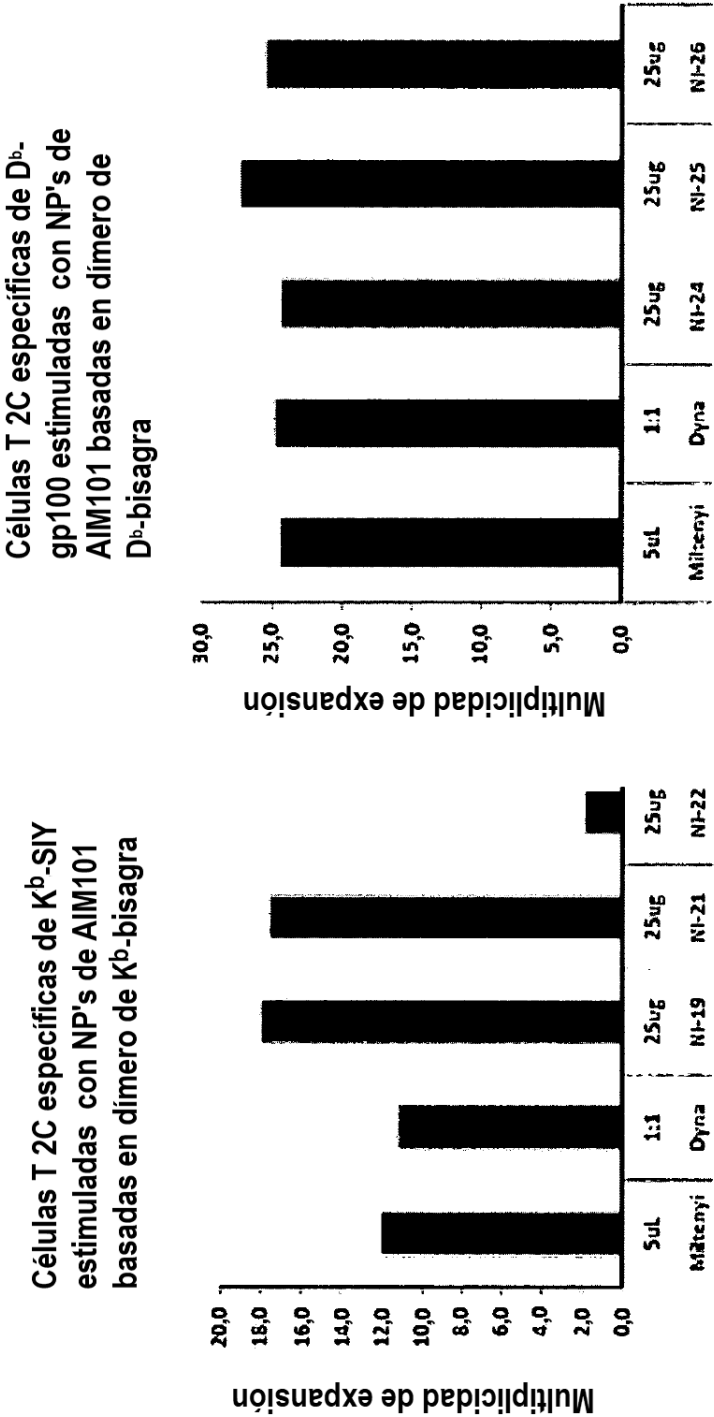


FIGURA 30

Expansión basada en aAPC de células T CMV humanas o Mart-1

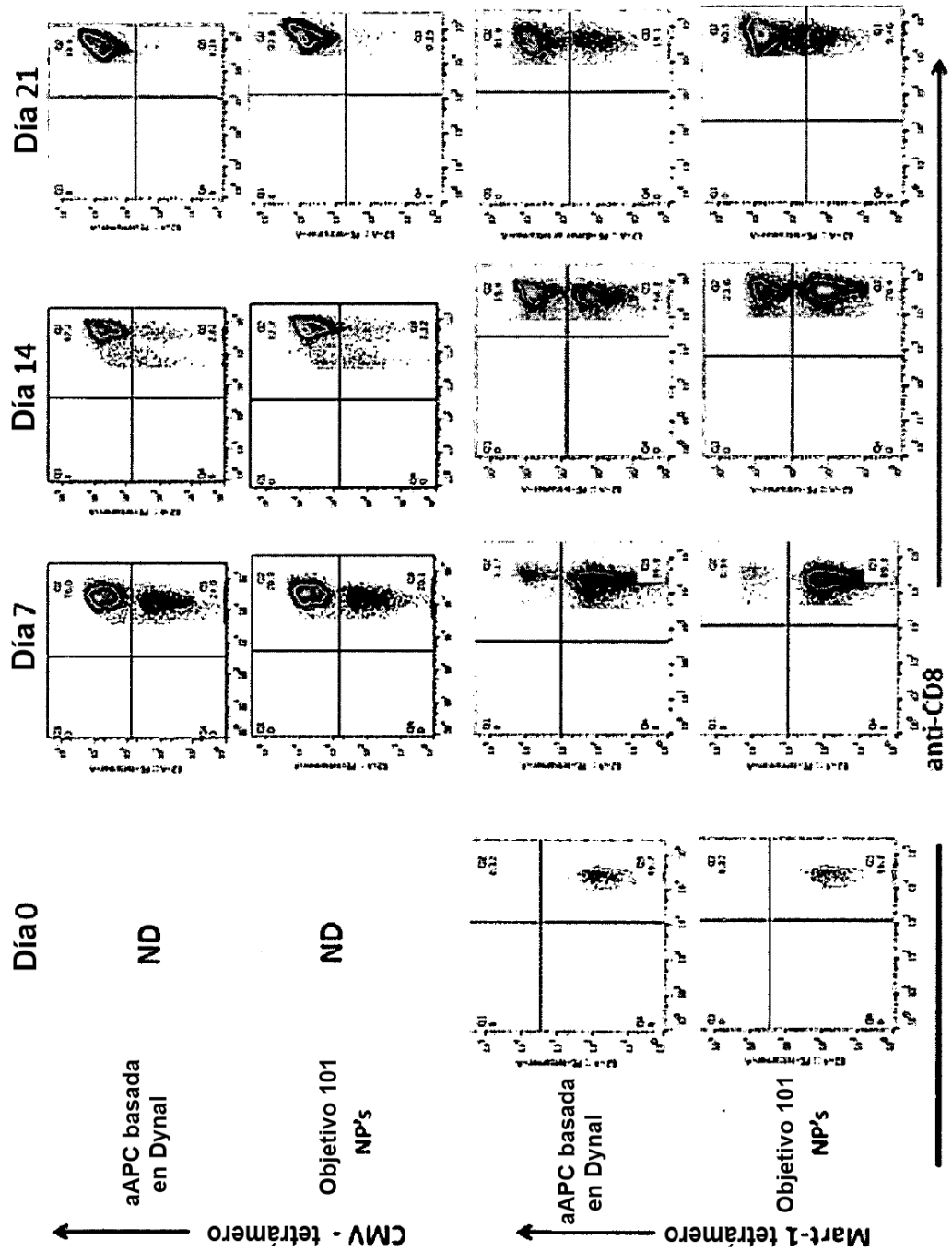


FIGURA 31

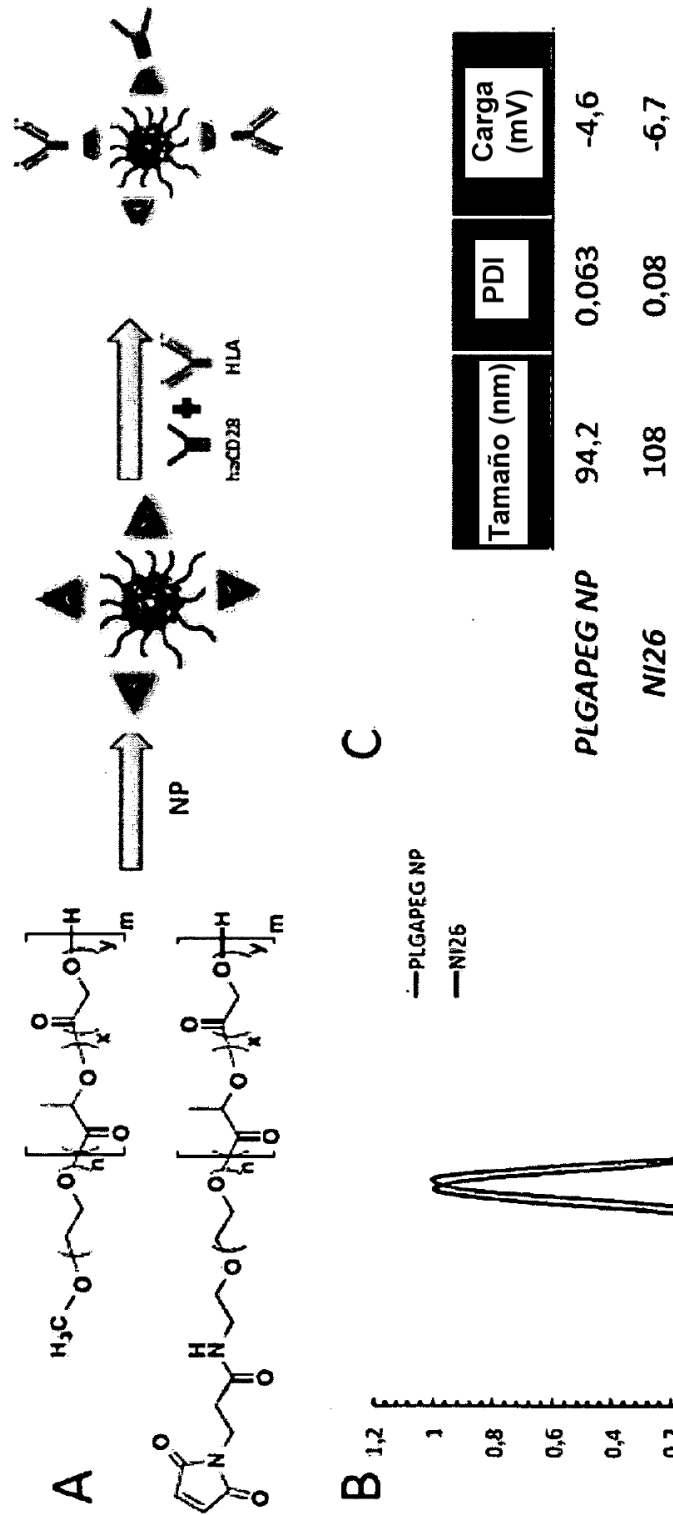


FIGURA 32

Lote	Contenido de maleimida (% p*p)	Tamaño promedio (nm)	ξ (mV)	μ g de entrada de Prot/mg NP	Eficiencia de acoplamiento, %	# de ligandos/NP
NI19	5	91,8	-8,7	51,5	41,6	45,8
NI20	25	95,9	-4,9	51,5	95,8	120,2
NI21	55	98	-3,1	51,5	93,5	125,2
NI22	55	102	-8,6	51,5	79,1	119
NI23*	0	68	-9,2	51,5	-----	-----
NI24	1	80,9	-2,5	51,5	22,9	17,3
NI25	10	92,9	-5,8	51,5	67,2	76,8
NI26	10	108	-6,7	51,5	59,6	106,8

* El lote NI23 se utilizó para determinar la cantidad de proteína que absorbe de forma inespecífica a las nanopartículas. La cantidad de proteína absorbida forma inespecífica se encontró < 3 %.