

**ENSAYO PARA MEDIR LA POTENCIA DE LAS INTERACCIONES DEL
RECEPTOR-LIGANDO EN NANOMEDICINAS**

REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS

5 [0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos de América No. de Serie 62/483,298 presentada el 7 de abril de 2017, que se incorpora como referencia en este documento, en su totalidad.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Las enfermedades autoinmunes como la diabetes tipo 1 (T1D), la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide son el resultado de respuestas autoinmunes crónicas que involucran a las células T y las células B que reconocen numerosos
15 epítopos antigénicos en listas de autoantígenos incompletamente definidas (Santamaria, P. (2010) Immunity 32: 437-445; Babbe, H. et al. (2000) J. Exp. Med. 192: 393-404; Firestein, GS (2003) Nature 423: 356-361). Actualmente no es posible eliminar o suprimir todas las especificidades de
20 células T autorreactivas policlonales (conocidas y desconocidas) en cada trastorno autoinmune individual, sin comprometer la inmunidad sistémica.

[0003] Recientemente se descubrió que las nanopartículas junto con las moléculas antígeno del complejo mayor de

histocompatibilidad (pMHC) pueden desencadenar la reprogramación y expansión de las células T reguladoras tipo 1 (TR1) in vivo. Consultar la solicitud PCT No. PCT/IB2016/000691. Sin embargo, no existe un método de alto

5 rendimiento para medir la potencia biológica y expansiva de las nanopartículas acopladas a pMHC in vitro o complejos de pMHC desacoplados a una nanopartícula, dada la necesidad de clones estables de células T específicas de antígeno, la interexperimental altamente variable variabilidad asociada

10 con el uso de células primarias, y la pobre reproducibilidad cuantitativa interexperimental de las lecturas distales del evento desencadenante del receptor de antígeno. Además, los métodos en la técnica (por ejemplo, los eventos de señalización de TCR proximal semicuantitativos medidos

15 mediante transferencia Western) no pueden imitar de cerca la compleja relación entre la densidad de pMHC en nanopartículas y la actividad biológica, en un rango de concentración. Como resultado, estos métodos no pueden predecir fielmente si una preparación particular es de calidad suficiente para producir

20 respuestas biológicas óptimas. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de desarrollar métodos in vitro, para medir la potencia agonista o expansiva de un pMHC. Esta divulgación satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

[0004] Las enfermedades autoinmunes como la diabetes tipo 1 (T1D), la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide, son el resultado de respuestas autoinmunes crónicas que implican a las células T y las células B que reconocen numerosos epítomos antigénicos en listas de autoantígenos incompletamente definidas (Santamaria, P. (2010) *Immunity* 32: 437-445; Babbe, H. et al. (2000) *J. Exp. Med.* 192: 393-404; Firestein, GS (2003) *Nature* 423: 356-361). Actualmente no es posible eliminar o suprimir todas las especificidades de células T autorreactivas policlonales (conocidas y desconocidas) en cada trastorno autoinmune individual, sin comprometer la inmunidad sistémica.

[0005] La transferencia adoptiva de células T reguladoras policlonales FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺ (T_{reg}) expandidas ex vivo, se ha propuesto como un enfoque terapéutico alternativo (Sakaguchi, S. et al. (2006) *Immunol. Rev.* 212: 8-27). El potencial para la inmunosupresión ajena, la falta de estrategias efectivas para expandir las células T_{reg} específicas de antígeno in vitro, y la inestabilidad del linaje de las células T_{reg} FOXP3⁺ han obstaculizado la traducción clínica de este enfoque (Zhou, X. et al. (2009) *Nature Immunol* 10:1000-1007; Komatsu, N. et al. (2014) *Nature Med.* 20: 62-68; Bailey-Bucktrout, SL et al. (2013) *Immunity*

39: 949-962). Las células T FOXP3⁺CD4⁺CD25⁻ TR1, que producen las citocinas IL-10 e IL-21 y expresan los marcadores de superficie CD49b y LAG-3 y el factor de transcripción c-Maf 8, constituyen otro subconjunto regulador de células T

5 recientemente explotado para el tratamiento de enfermedades inflamatorias humanas (McLarnon, A. (2012) *Nature Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9: 559; Desreumaux, P. et al. (2012) *Gastroenterology* 143:1207-1217; Roncarolo, MG et al. (2011) *Immunol. Rev.* 241:145-163). Sin embargo, al igual que con las

10 células TFP3⁺ T_{reg}, no existen enfoques farmacológicos que puedan expandir las células tipo TR1 específicas de enfermedades o autoantígenos in vivo.

[0006] El solicitante ha demostrado previamente que el suministro sistémico de nanopartículas recubiertas con

15 enfermedad autoinmune relevante (Patente de EE. UU. No. 8,354,110), gastrointestinal relevante (WO 2013/144811), o cáncer o tumor relevantes (Patente de EE. UU. No. 9,511,151). Los péptidos unidos a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, desencadenan la generación y expansión

20 de células reguladoras específicas de antígeno en diferentes modelos de ratones, incluidos ratones humanizados con linfocitos de pacientes, lo que lleva a la resolución de fenómenos autoinmunes establecidos (ver también WO 2016/198932 y Clemente-Casares, X. et al. (2016) "

Expanding antigen-specific regulatory networks to treat autoimmunity," Nature 530:434-440). Sin embargo, no existe un método de alto rendimiento para medir la potencia biológica y expansiva de las nanopartículas acopladas a pMHC in vitro o complejos de pMHC desacoplados a una nanopartícula, dada la necesidad de clones estables de células T específicas de antígeno, los desafíos técnicos y la variabilidad interexperimental altamente variable, asociada con el uso de células primarias, y la escasa reproducibilidad cuantitativa interexperimental de las lecturas distales al evento desencadenante del receptor de antígeno.

[0007] Los datos presentados aquí proporcionan resultados inesperados, porque las interacciones primarias del péptido TCR-MHC se modelan con precisión in vitro mediante una línea celular transducida/transfectada con un marcador dependiente de la vía y el complejo receptor (correceptor TCR más CD4 o CD8), que responde con su ligando natural (moléculas de péptido MHC clase II o péptido MHC clase I). Ver la Figura 1 I vs J. Los métodos y composiciones descritos en esta descripción son generalmente aplicables a la medición de la potencia de una nanomedicina que comprende un ligando o receptor que interactúa con una célula que expresa su receptor o ligando afín. Por ejemplo, los métodos y composiciones descritos en este documento pueden usarse

para diseñar nanomedicinas que comprenden una nanopartícula descrita en el presente y un ligando para un receptor que puede desplegarse para modificar y reprogramar respuestas celulares in vivo. Por ejemplo, la función de las células beta está influenciada positivamente por la unión a E, P y N-cadherina. Los métodos y composiciones descritos en el presente documento permiten el desarrollo y la prueba de composiciones de materia que comprenden una nanopartícula y E, P o N-cadherina. Dichas composiciones pueden aparearse con una línea celular apropiada, tal como una línea celular Min6 (línea de células beta sensibles a la glucosa), con un marcador de células beta que se puede elegir por su respuesta a la glucosa.

[0008] En realizaciones específicas, esta descripción proporciona composiciones y métodos para medir la actividad agonista o antagonista o "potencia" de un complejo de pMHC que está opcionalmente unido a una nanopartícula. En un aspecto, se proporciona una célula aislada transducida con uno o más polinucleótidos que codifican: un receptor de células T recombinante (TCR); un marcador dependiente de la vía TCR; y un correceptor que se une a un ligando del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o clase II. En otro aspecto, las células expresan un complejo de señalización de cadena CD3 de múltiples subunidades,

asociado a TCR. Además, en otra realización, las células se transducen con uno o más polinucleótidos que codifican receptores o ligandos para una o más de una molécula coestimuladora o una citocina.

- 5** [0009] Los ejemplos no limitantes de ligandos de MHC se seleccionan del clúster de receptores a unirse: una proteína MHC clásica clase I, una proteína MHC no clásica clase I, una proteína MHC clásica clase II, una proteína MHC no clásica clase II proteína, un dímero de MHC (fusiones de Fc), un
- 10** tetrámero de MHC o una forma polimérica de una proteína de MHC. En un aspecto, el polinucleótido codifica un correceptor MHC de clase I tal como CD8. En otro aspecto, el polinucleótido codifica un correceptor MHC de clase II tal como CD4. Los polinucleótidos están opcionalmente unidos
- 15** operativamente a elementos reguladores que impulsan la expresión de los polinucleótidos y, además, opcionalmente un elemento potenciador.

- [0010] En un aspecto, el polinucleótido (s) que codifica el receptor de células T codifica $\text{TCR}\alpha$ o $\text{TCR}\beta$ que
- 20** opcionalmente contienen elementos reguladores unidos operativamente a los polinucleótidos que codifican $\text{TCR}\alpha$ o $\text{TCR}\beta$. Estos polinucleótidos pueden opcionalmente comprender además una secuencia de salto de ribosomas. En un aspecto, la secuencia de salto de ribosomas comprende, o además consiste

esencialmente, o alternativamente, en una secuencia de salto de ribosomas 2A. Los ejemplos no limitativos de la secuencia de salto de ribosomas 2A comprenden, o alternativamente, consisten esencialmente en, o además consisten en, una
5 secuencia de salto de ribosoma F2A, aT2A o P2A, o una combinación de los mismos.

[0011] En otro aspecto, el marcador dependiente de la vía TCR es un marcador de la activación de TCR o la activación de la vía TCR, que opcionalmente puede
10 proporcionar una o más mediciones de expresión génica, actividad, localización de proteínas, modificación de proteínas o interacción proteína-proteína. En otro aspecto, el marcador dependiente de la vía TCR comprende, o
alternativamente, consiste esencialmente en, o además
15 consiste en, una proteína seleccionada del clúster de: luciferasa, una beta lactamasa, CAT, SEAP o una proteína fluorescente. En otro aspecto adicional, el marcador dependiente de la vía TCR comprende un factor nuclear de
secuencia de ADN o promotor de unión al factor de
20 transcripción de células T activadas (NFAT).

[0012] En otra realización, la célula se ha transducido con un polinucleótido que codifica un complejo de señalización de cadena de CD3 de múltiples subunidades asociado a TCR que está opcionalmente acoplado operativamente

a secuencias reguladoras, para la expresión del complejo de señalización de CD3 en la superficie de las células, por ejemplo, promotores o potenciadores. En una realización, la célula no expresa endógenamente un complejo de señalización de CD3.

[0013] Las células son útiles para determinar el potencial de activación de cualquier antígeno, ejemplos de tales incluyen, sin limitación, un antígeno autoinmune o relevante para el cáncer que se acopla opcionalmente al MHC (pMHC). Los pMHC están opcionalmente acoplados a un núcleo de nanopartículas u otro vehículo. En un aspecto, el pMHC está acoplado en un núcleo de nanopartículas, opcionalmente a través de un conector al núcleo o mediante un recubrimiento en el núcleo. El número de pMHC por núcleo de nanopartículas puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1000:1, y varía entre 10:1 a aproximadamente 1000:1. El núcleo de nanopartículas puede comprender opcionalmente además una pluralidad de moléculas coestimuladoras o citocinas, según sea apropiado.

[0014] En un aspecto particular, el pMHC, la citocina o la molécula coestimuladora se acoplan con el núcleo de nanopartículas a través de un recubrimiento en el mismo. El recubrimiento puede ser, por ejemplo, un polímero, opcionalmente un recubrimiento de polietilenglicol (PEG), y

el número de pMHC, la citocina o la molécula coestimuladora, por núcleo, se puede medir por "densidad" o el número de pMHC por área de superficie del núcleo de nanopartículas recubiertas con el polímero. Se puede medir cualquier

5 densidad, por ejemplo, de aproximadamente 0.025 pMHC/100 nm² a aproximadamente 100 pMHC/100 nm² por área de superficie del núcleo de nanopartículas, y oscila entre 0.025 pMHC/100 nm² a aproximadamente 100 pMHC/100 nm² por área de superficie del núcleo de nanopartículas.

10 [0015] Cualquier célula eucariota apropiada se puede transducir con polinucleótidos que codifican los elementos necesarios; ejemplos no limitativos de tales incluyen JurMA, Jurkat, BW5147, HuT-78, CEM o Molt-4. Las células pueden ser de cualquier especie apropiada, animal, mamífero, por

15 ejemplo, humano. En otro aspecto, cuando la célula se va a transducir con un polinucleótido que codifica el complejo de señalización de la cadena CD3, la célula no expresa endógenamente el complejo de señalización de la cadena CD3

[0016] Además, se proporciona una población de las

20 células identificadas aquí, en donde en un aspecto es sustancialmente homogéneo. Los métodos para cultivar las células y las poblaciones de células se proporcionan adicionalmente en el presente.

[0017] La divulgación también proporciona métodos para

preparar las células aisladas, como se describe en el presente documento. En un aspecto, el método comprende, o alternativamente consiste esencialmente, o además consiste en, transducir una célula aislada con uno o más

5 polinucleótidos que codifican: un receptor de células T recombinante (TCR); y un marcador dependiente de la vía TCR; y un correceptor que se une al ligando del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o clase II. En una realización, el método comprende, o alternativamente consiste

10 esencialmente, o además consiste en, transducir una célula aislada con un polinucleótido que codifica el complejo de señalización de cadena CD3 de múltiples subunidades asociado a TCR. El método comprende además cultivar las células en condiciones que favorecen la expresión de uno o más

15 polinucleótidos que codifican un receptor de células T recombinante (TCR), un marcador dependiente de la vía TCR y un receptor que se une a los ligandos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I o clase II (MHC). En otra realización, el método comprende además cultivar las células

20 en condiciones que favorecen la expresión de un complejo de señalización de cadena CD3 de múltiples subunidades asociado a TCR.

[0018] En una realización adicional, los métodos comprenden, además, o alternativamente consisten

esencialmente en, o además consisten en, transducir una célula con uno o más polinucleótidos que expresan receptores o ligandos para uno o más de: una pluralidad de moléculas coestimuladoras, una pluralidad de anticuerpos coestimuladores, una pluralidad de anticuerpos inhibidores de bloqueo del receptor, o una pluralidad de citocinas.

[0019] Las células que expresan los receptores y los productos de expresión de polinucleótidos transducidos pueden identificarse mediante cualquier método apropiado conocido en la técnica usando, por ejemplo, ligandos o anticuerpos marcados de forma detectable que se unen a los productos de expresión mediante métodos conocidos en la técnica, tales como citometría de flujo.

[0020] Tras la transducción de las células, estas crecen en condiciones que favorecen la expresión de los polinucleótidos y la producción de una población celular.

[0021] Las células y las poblaciones celulares son útiles en un método in vitro para medir la actividad agonista o antagonista de una composición que comprende un complejo antígeno-MHC (pMHC) (opcionalmente unido a un núcleo de nanopartículas) y opcionalmente una molécula coestimuladora o una citocina, poniendo en contacto la composición con una célula aislada, como se describe en el presente documento, que favorece la unión de los receptores a sus ligandos, y

luego, detectando cualquier señal marcadora dependiente de la vía TCR producida por el marcador. Como es evidente para el experto en la técnica, la composición y la célula se seleccionan para una interacción probable, por ejemplo, la
5 composición contiene una molécula de TCR específica de pMHC de clase II y la célula expresa un correceptor de MHC de clase II, por ejemplo, CD4.

[0022] En un aspecto, después de poner en contacto la célula con la composición, se cuantifica cualquier señal
10 marcadora producida por las células o la población. La respuesta medida puede catalogarse y luego compararse con la señal cuantificada con una medición predeterminada o predeterminada de la actividad agonista o antagonista para controlar la efectividad de una terapia contra otras terapias
15 o composiciones. Cuando la composición comprende una molécula coestimuladora y las células y las poblaciones celulares expresan los receptores apropiados, la respuesta medida puede catalogarse y luego compararse con la señal cuantificada, mediante una medición predeterminada o predeterminada de la
20 actividad antagonista para controlar efectividad de una terapia contra otras terapias o composiciones.

[0023] Por lo tanto, ciertos aspectos de la divulgación se refieren a una combinación que comprende al menos una célula transducida aislada o una población celular

transducida, como se describe en el presente documento, un complejo aislado, el cual comprende, o alternativamente, consiste esencialmente en, o además tiene, núcleos de nanopartículas acoplados a una pluralidad de complejos de pMHC, en donde los núcleos de nanopartículas opcionalmente comprenden adicionalmente, o además consisten en los mismos, o alternativamente consisten adicionalmente, esencialmente en, una o más moléculas coestimuladoras o una o más citocinas acopladas al núcleo de nanopartículas.

- 5** [0024] Para estas composiciones que contienen una pluralidad de complejos, los complejos de pMHC en cada núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o el MHC de los complejos pMHC en cada núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o las citocinas en cada núcleo
- 10** de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o las moléculas coestimuladoras en cada núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o los diámetros de los núcleos de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o la valencia de los complejos pMHC en cada núcleo de
- 15** nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o la densidad de los complejos de pMHC en cada núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o la valencia o densidad de las moléculas coestimuladoras en cada
- 20** núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o

la valencia o densidad de las citocinas en cada núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí.

[0025] En un aspecto, descrito aquí, es una composición que comprende: (a) al menos una célula que comprende (i) un receptor de células T recombinante (TCR) que comprende una cadena de TCR alfa y una cadena de TCR beta; y (ii) un marcador dependiente de la vía del receptor de células T, en el que el TCR recombinante es específico para un antígeno relevante para la enfermedad unido a una molécula de histocompatibilidad (MHC) principal; y (b) una nanomedicina, que comprende un antígeno relevante para la enfermedad unido a una molécula de MHC acoplada a una nanopartícula. En ciertas realizaciones, el marcador dependiente de la vía del receptor de células T se transcribe activamente. En ciertas realizaciones, el antígeno relevante para la enfermedad unido a la molécula de MHC está acoplado a la nanopartícula en una proporción de 10:1 o mayor. En ciertas realizaciones, la nanopartícula tiene un diámetro de entre 1 nanómetro y 100 nanómetros. En ciertas realizaciones, la nanopartícula comprende un núcleo metálico. En ciertas realizaciones, el antígeno relevante para la enfermedad es un antígeno relevante para la enfermedad autoinmune o inflamatoria. En ciertas realizaciones, el antígeno autoinmune o inflamatorio relevante para la enfermedad se selecciona de la lista que

consiste en, un antígeno de asma o asma alérgico, un antígeno de diabetes mellitus tipo I, un antígeno de esclerosis múltiple, un antígeno de neuropatía periférica, un antígeno de cirrosis biliar primaria, un antígeno del trastorno del

5 espectro óptico de la neuromielitis, un antígeno del síndrome de persona rígida, un antígeno de encefalitis autoinmune, un antígeno de pénfigo vulgar, un antígeno de pénfigo foliáceo, un antígeno de psoriasis, un antígeno de enfermedad/síndrome de Sjögren, un antígeno de enfermedad inflamatoria

10 intestinal, una artritis o artritis reumatoide antígeno, un antígeno lupus eritematoso sistémico, un antígeno de esclerodermia, un antígeno de vasculitis asociado a ANCA, un antígeno del síndrome de Goodpasture, un antígeno de la enfermedad de Kawasaki, una enfermedad celíaca, un antígeno

15 de cardiomiopatía autoinmune, un antígeno de miastenia Graves, un antígeno de uveítis autoinmune, un antígeno de la enfermedad de Graves, un antígeno del síndrome antifosfolípido, un antígeno de hepatitis autoinmune, un antígeno de colangitis esclerosante, un antígeno de

20 colangitis esclerosante primario, un antígeno de enfermedad pulmonar obstructiva crónica o un antígeno relevante de uveítis, y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el marcador dependiente de la vía del receptor de células T activa la transcripción de un gen seleccionado

del clúster que consiste en, un gen de luciferasa, un gen de beta lactamasa, un gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), un gen secretado de fosfatasa alcalina embrionaria (SEAP), un gen de proteína fluorescente y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el marcador dependiente de la vía del receptor de células T consiste en, una secuencia de polinucleótidos seleccionada de la lista que comprende un factor nuclear de células T activadas (NFAT), secuencia de ADN o promotor de unión al factor de transcripción, una unión al factor de transcripción NF- κ B Secuencia o promotor de ADN, un factor de transcripción AP1 de unión a la secuencia de ADN o promotor, un factor de transcripción IL-2 de unión a la secuencia de ADN o promotor y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, la al menos una célula se selecciona de JurMA, Jurkat, BW5147, HuT-78, CEM o Molt-4. En ciertas realizaciones, el antígeno relevante para la enfermedad es un polipéptido que consiste en, uno cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 352 y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el antígeno relevante para la enfermedad es un polipéptido que consiste en, cualquiera de las SEQ ID NO: 353 a 455 y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa y la cadena de TCR beta se traducen como un polipéptido único. En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa y la cadena

de TCR beta del polipéptido único están separadas por una secuencia de salto de ribosomas. En ciertas realizaciones, la secuencia de salto de ribosomas se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 456 a 523. En ciertas realizaciones, el

5 polipéptido único comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 90%, 95% o 100% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 527, 533 o 538. En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa y la cadena de TCR beta se traducen como polipéptidos separados. En ciertas realizaciones, la cadena

10 de TCR alfa y la cadena de TCR beta, en donde la cadena de TCR alfa comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 90%, 95% o 100% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 528, 530, 534, 536 539, 541, y la cadena de TCR beta comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 90%, 95% o 100%

15 idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 529, 531, 535, 537, 540 o 542. En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa y la cadena de TCR beta se expresan en la superficie de la célula. En ciertas realizaciones, la célula comprende al menos un polinucleótido exógeno que codifica la cadena de TCR

20 alfa y la cadena de TCR beta. En ciertas realizaciones, el al menos un polinucleótido exógeno comprende una secuencia de ácido nucleico IRES. En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico IRES se establece en una cualquiera de las SEQ ID NO: 524 a 526. En ciertas realizaciones, el

polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 80%, 90%, 95% o 100% homólogo según lo establecido en cualquiera de las SEQ ID NO: 532 o 557. En ciertas realizaciones, la composición es para uso in vitro para
5 determinar la potencia o actividad de una nanomedicina. En ciertas realizaciones, la nanomedicina es para uso en un individuo humano.

[0026] En otro aspecto, descrito aquí, es una célula que comprende un receptor de células T recombinante (TCR) y un
10 marcador dependiente de la vía del receptor de células T, en el que el receptor de células T recombinante es específico para un antígeno relevante para la enfermedad unido a un complejo mayor de histocompatibilidad. En ciertas realizaciones, el marcador dependiente de la vía del receptor
15 de células T se transcribe activamente. En ciertas realizaciones, el antígeno relevante para la enfermedad es un antígeno relevante para la enfermedad autoinmune o inflamatoria. En ciertas realizaciones, el antígeno autoinmune o inflamatorio relevante para la enfermedad se
20 selecciona de la lista que consiste en, un antígeno de asma o asma alérgico, un antígeno de diabetes mellitus tipo I, un antígeno de esclerosis múltiple, un antígeno de neuropatía periférica, un antígeno de cirrosis biliar primaria, un antígeno del trastorno del espectro óptico de la

neuromielitis, un antígeno del síndrome de persona rígida, un antígeno de encefalitis autoinmune, un antígeno de pénfigo vulgar, un antígeno de pénfigo foliáceo, un antígeno de psoriasis, un antígeno de enfermedad/síndrome de Sjögren, un

5 antígeno de enfermedad inflamatoria intestinal, una artritis o artritis reumatoide antígeno, un antígeno lupus eritematoso sistémico, un antígeno de esclerodermia, un antígeno de vasculitis asociado a ANCA, un antígeno del síndrome de Goodpasture, un antígeno de la enfermedad de Kawasaki, una

10 enfermedad celíaca, un antígeno de cardiomiopatía autoinmune, un antígeno de miastenia Graves, un antígeno de uveítis autoinmune, un antígeno de la enfermedad de Graves, un antígeno del síndrome antifosfolípido, un antígeno de hepatitis autoinmune, un antígeno de colangitis

15 esclerosante, un antígeno de colangitis esclerosante primario, un antígeno de enfermedad pulmonar obstructiva crónica o un antígeno relevante de uveítis, y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el marcador dependiente de la vía del receptor de células T activa la

20 transcripción de un gen seleccionado del clúster que consiste en, un gen de luciferasa, un gen de beta lactamasa, un gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), un gen secretado de fosfatasa alcalina embrionaria (SEAP), un gen de proteína fluorescente y combinaciones de los mismos. En ciertas

realizaciones, el marcador dependiente de la vía del receptor de células T comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de la lista que consiste en, un factor nuclear de células T activadas (NFAT) o promotor de secuencia de ADN de unión al factor de transcripción, un factor de transcripción NF- κ B de unión a la secuencia de ADN o promotor, un factor de transcripción AP1 de unión a la secuencia de ADN o promotor, un factor de transcripción IL-2 de unión a la secuencia de ADN o promotor y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, la célula se selecciona de JurMA, Jurkat, BW5147, HuT-78, CEM o Molt-4. En ciertas realizaciones, el antígeno relevante para la enfermedad es un polipéptido que consiste en, uno cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 352 y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el antígeno relevante para la enfermedad es un polipéptido que consiste en, cualquiera de las SEQ ID NO: 353 a 455 y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa y la cadena de TCR beta se traducen como un polipéptido único. En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa y la cadena de TCR beta del polipéptido único, están separadas por una secuencia de salto de ribosomas. En ciertas realizaciones, la secuencia de salto de ribosomas se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 456 a 523. En ciertas realizaciones, el polipéptido único

comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 90%, 95% o 100% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 527, 533 o 538. En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa y la cadena de TCR beta se traducen como polipéptidos separados.

- 5** En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa y la cadena de TCR beta, en donde la cadena de TCR alfa comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 90%, 95% o 100% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 528, 530, 534, 536 539, 541, y la cadena de TCR beta comprende una secuencia de
- 10** aminoácidos al menos 80%, 90%, 95% o 100% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 529, 531, 535, 537, 540 o 542. En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa y la cadena de TCR beta se expresan en la superficie de la célula. En ciertas realizaciones, la célula comprende al menos un
- 15** polinucleótido exógeno que codifica la cadena de TCR alfa y la cadena de TCR beta. En ciertas realizaciones, el al menos un polinucleótido exógeno comprende una secuencia de ácido nucleico IRES. En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico IRES se establece en una cualquiera de las SEQ
- 20** ID NO: 524 a 526. En ciertas realizaciones, el al menos un polinucleótido exógeno comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 80%, 90%, 95%, o 100% homólogo a lo establecido en cualquiera de las SEQ ID NO: 532 o 557. En ciertas realizaciones, la célula es una población celular. En

ciertas realizaciones, la célula o la población celular son para uso in vitro para determinar una potencia o actividad de una nanomedicina. En ciertas realizaciones, la nanomedicina es para uso en un individuo humano.

- 5** [0027] En otro aspecto descrito en el presente documento, se describe un método in vitro para medir la actividad agonista de una nanomedicina que comprende un antígeno relevante para la enfermedad unido a una molécula de MHC acoplada a una nanopartícula, el método comprende: (a)
- 10** poner en contacto la nanomedicina con la célula o población celular descrita en el presente documento; y (b) detectar una señal producida por el marcador dependiente de la vía del receptor de células T. En ciertas realizaciones, la nanomedicina comprende una pluralidad de nanopartículas. En
- 15** ciertas realizaciones, la pluralidad de nanopartículas comprende una pluralidad de nanopartículas que comprenden una pluralidad de antígenos relevantes para la enfermedad unidos a una molécula de MHC acoplada a la nanopartícula. En ciertas realizaciones, el antígeno relevante para la enfermedad es un
- 20** antígeno relevante para la enfermedad autoinmune o inflamatoria. En ciertas realizaciones, el antígeno relevante para la enfermedad autoinmune o inflamatoria se selecciona de la lista que consiste en, un antígeno de diabetes mellitus tipo I, un antígeno de asma o asma alérgico, un antígeno de

esclerosis múltiple, un antígeno de neuropatía periférica, un antígeno de cirrosis biliar primaria, un antígeno del trastorno del espectro óptico de la neuromielitis, un antígeno del síndrome de persona rígida, un antígeno de

5 encefalitis autoinmune, un antígeno de pénfigo vulgar, un antígeno de pénfigo foliáceo, un antígeno de psoriasis, un antígeno de enfermedad/síndrome de Sjögren, un antígeno de enfermedad inflamatoria intestinal, una artritis o artritis reumatoide antígeno, un antígeno lupus eritematoso sistémico,

10 un antígeno de esclerodermia, un antígeno de vasculitis asociado a ANCA, un antígeno del síndrome de Goodpasture, un antígeno de la enfermedad de Kawasaki, una enfermedad celíaca, un antígeno de cardiomiopatía autoinmune, un antígeno de miastenia Graves, un antígeno de uveítis

15 autoinmune, un antígeno de la enfermedad de Graves, un antígeno del síndrome antifosfolípido, un antígeno de hepatitis autoinmune, un antígeno de colangitis esclerosante, un antígeno de colangitis esclerosante primario, un antígeno de enfermedad pulmonar obstructiva

20 crónica o un antígeno relevante de uveítis, y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, la pluralidad de nanopartículas comprende una pluralidad de nanopartículas con un diámetro de 1 nanómetro a aproximadamente 100 nanómetros. En ciertas realizaciones, el método comprende además

cuantificar la señal del marcador dependiente de la vía del receptor de células T. En ciertas realizaciones, la cuantificación comprende determinar una concentración de la nanomedicina que inicia una respuesta que es aproximadamente el 50% de una respuesta máxima, en donde la respuesta máxima es la respuesta iniciada a la concentración más alta de nanomedicina contactada con la célula o población celular cuando se pone en contacto una pluralidad de concentraciones de la nanomedicina con la célula o población celular. En ciertas realizaciones, la pluralidad de las concentraciones de la nanomedicina se pone en contacto con la célula o población celular en el mismo ensayo. En ciertas realizaciones, la cuantificación comprende determinar una concentración de la nanomedicina que inicia una respuesta que es al menos aproximadamente 200% de un control negativo; en donde el control negativo comprende una nanomedicina que no interactúa específicamente con el receptor de células T recombinante (TCR) de la célula o la población celular. En ciertas realizaciones, la señal es producida por una enzima. En ciertas realizaciones, la enzima es luciferasa o peroxidasa. En ciertas realizaciones, la señal es una señal fluorescente. En ciertas realizaciones, el método se utiliza como paso de control de calidad en un proceso de fabricación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0028] Las siguientes Figuras forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la misma. La divulgación puede entenderse mejor con referencia a uno o más de estos dibujos, en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas también en este documento.

- 5** [0029] Figuras 1A-1J Muestran los efectos del tamaño de NP y la valencia de pMHC sobre la actividad agonista de células T y la señalización de TCR.
- 10** Figura 1A Muestra la producción de IFN γ por las células T 8.3-CD8⁺ en respuesta a NRP-V7/Kd-SFP, en función de la valencia de pMHC y los números de NP.
- 15** Figura 1B Muestra las propiedades agonísticas de los NRP-V7/Kd-SFP de la Figura 1A, en función de la concentración de pMHC en el ensayo.
- 20**

- Figuras 1C-1D
- 5** Muestran la producción de IFN γ por las células T 8.3-CD8⁺ en respuesta a PF conjugado con dos valencias NRP-V7/Kd diferentes, en función de la concentración de pMHC-NP (Figura 1C) o pMHC en el ensayo (Figura 1D).
- 10** Figuras 1E-1F Muestran la comparación de las propiedades agonísticas de los NP pequeños (SFP) frente a los más grandes (PF) recubiertos con valencias NRP-V7/Kd bajas, en función de la concentración de pMHC-NP (Figura 1E) o pMHC (Figura 1F). Los datos en las
- 15** Figuras 1A-1F corresponden a los valores promedio + SEM de la secreción de IFN γ en pocillos por triplicado (las barras de error
- 20**

5

10

15

Figura 1G

20

generalmente eran más pequeñas que el tamaño de los símbolos utilizados para mostrar los datos) y cada panel corresponde a un representante de al menos tres experimentos independientes. Los controles negativos implicaron el uso de NP no conjugados o conjugados con Cys a una alta concentración de NP (es decir, 50×10^{11} NP/ml en a), produciendo valores de IFN γ cero.

Muestra la comparación de las propiedades agonísticas de los NP de PF conjugados con 10 valencias de BDC2.5mi/IA^{g7} diferentes en células T BDC2.5-CD4⁺, en función de la concentración de pMHC-NP (arriba) o pMHC

(abajo). Los datos mostrados corresponden a un experimento. Los datos para 5 y 10 μg de pMHC se repitieron dos veces más con resultados similares. Como control negativo, el solicitante usó NP conjugados con Cys a una concentración de hierro equivalente a la de 10 μg pMHC/mL de la preparación 10 pMHC/NP (95×10^{11} NP/mL), produciendo valores de IFN γ cero.

Figura 1H

Muestra la relación entre la valencia y la densidad BDC2.5mi/IA⁹⁷ (eje horizontal inferior y superior, respectivamente) en los NP de PF (agrupadas según las densidades subumbral, umbral, mínima óptima y supraumbral) y la

5

10

Figura 1I

15

20

actividad agonista en células T BDC2.5-CD4⁺ a 10 µg/ml (izquierda) y 5 µg/ml (derecha) (concentraciones de pMHC que producen una actividad agonista casi máxima). Los valores de P entre subumbral/umbral frente a las valencias óptimas mínimas de valencia/supraumbral se calcularon a través de Mann-Whitney U.

Muestra actividad de luciferasa (promedio + SEM de triplicados) en células JurMA BDC2.5- TCR/mCD4/NFAT que expresan luciferasa en respuesta a la estimulación durante varios períodos de tiempo con BDC2.5mi/IA^{g7}-PF-M (12.5 µg/mL), mAb anti hCD3ε soluble (10 µg/mL) y PMA/ionomicina. RLU

5

10

15

Figura 1J

20

(unidades de luz relativas). Como control negativo, el solicitante usó NP conjugados con Cys a una concentración de hierro equivalente a la de 5 μg pMHC/mL de la preparación de 10 pMHC/NP (45.5×10^{11} NP/mL), produciendo 1.05 RLU. Los datos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes por condición de estimulación. Los valores de P entre condiciones se calcularon mediante ANOVA de dos vías. Muestra la relación entre la valencia y la densidad BDC2.5mi/IA^{g7} (eje horizontal inferior y superior, respectivamente) en los NP de PF (agrupados de acuerdo con las

5

10 [0030] Figuras 2A y 2B

Figura 2A

15

20

subdensidades, umbrales, densidades mínimas óptimas y supraumbrales) y la actividad agonista en células JurMA BDC2.5-TCR/mCD4/NFAT que expresan luciferasa a 5 µg/ml. Los valores de P se calcularon a través de Mann-Whitney U. Muestran la representación esquemática de la unión de pMHC-NP a células T afines. Panel superior: representación esquemática de un nano clúster de TCR, compuesto por 16 unidades que abarcan 140 nm (suponiendo un tamaño globular de 4 nm de TCRαβ y un espacio de 5 nm), que se une a 4 pMHC-NP, densamente recubiertos (que transportan monómeros de pMHC separados por 4 nm

5

cada uno). La ilustración en el panel inferior ilustra cómo estos 4 pMHC-NP interactúan con las islas de TCR (izquierda) o nano clústers (derecha), como se ve desde la perspectiva del NP.

Figura 2B

10

Ilustra los pMHC-NP recubiertos en las valencias supraumbral, umbral e infraumbral (izquierda) y sus capacidades relativas para provocar la señalización de TCR en los clústers, teniendo en cuenta la avidéz de unión general, las tasas de asociación y disociación de pMHC-TCR, y ambos, corrección de pruebas cinéticas y modelos cooperativos de señalización de TCR. Los

15

20

5

10

15

20

[0031] Figuras 3A-3G

Figuras 3A y 3B

pMHC-NP capaces de ligar heterodímeros de TCR contiguos en estos clústers son eficientes para provocar la señalización de TCR. Estos modelos explican por qué los NP pequeños recubiertos con pMHC estrechamente adheridos tienen propiedades inmunológicas óptimas.

Muestran una unión y agrupación sostenidas de pMHC-NP en células T afines en función de la densidad de pMHC.

Muestran imágenes TEM 2D de células T BDC2.5mi-CD4⁺ (Figura 3A) o 8.3-CD8⁺ (Figura 3B) incubadas con BDC2.5mi/IA^{g7}- o NRP-V7/Kd-PF-M, respectivamente, recubierto a densidades de pMHC supraumbral (46

5

Figura 3C

10

15 Figura 3D

20

pMHCs/NP). Los dos paneles derechos en la Figura 3A y los cuatro paneles derechos en la Figura 3B muestran la presencia de NP en vesículas intracelulares después de 3 horas de incubación a 37°C.

Muestra imágenes TEM 2D de células T BDC2.5mi-CD4⁺ y 8.3-CD8⁺ incubadas con NRP-V7/Kd-PF-M y BDC2.5mi/IAg⁷-PF-M no relacionadas, respectivamente.

Panel izquierdo: imagen 3D: microscopía de súper resolución de células T 8.3-CD8⁺ incubadas con NRP-V7/Kd-PF-M-Alexa-647 a 4°C durante 30 min. Paneles medio y derecho: imágenes en 2D: células T incubadas a 4°C durante 30 minutos y posteriormente a 37°C

5

10

Figuras 3E y 3F

15

20

durante 1 hora. El gráfico del histograma muestra que los clústers de NP aumentan de diámetro con el tiempo y la temperatura de incubación (179.1 ± 4.6 nm a 401.7 ± 4.2 nm; $n = 100$ clústers/condición; valores de P calculados por Mann-Whitney U). Gris claro: NRP-V7/Kd-PF-MAlexa-647; Gris oscuro: DAPI. Barra: 1 μ m.

Muestran imágenes TEM 2D de células T BDC2.5mi-CD4⁺ incubadas con preparaciones BDC2.5mi/IA^{g7}-PF-M que transportan por debajo del umbral 10 pMHCs/NP; (e) o umbral (24 pMHCs/NP; (f) valencias de pMHC. Cuatro paneles izquierdos en la Figura 3E y la Figura 3F se muestra ausencia (e) o

5

Figura 3G

10

15

20

presencia (f) de microclústers en la membrana de células T. Dos paneles derechos en la Figura 3E y la Figura 3F se muestra la presencia de vesículas intracelulares.

Muestra el tamaño promedio de los microclústers en células cultivadas en presencia de pMHC-NP recubiertos a $(59.5 \pm 6.5 \text{ nm})$, $(271.2 \pm 17.3 \text{ nm})$ y $(370 \pm 21.3 \text{ nm})$; ($n = 50-60$ clústers en 9-15 células/condición). Los valores de P fueron calculados por Mann-Whitney U. Los experimentos descritos en esta Figura son repetibles y pueden reproducirse con resultados consistentes.

	[0032] Figuras 4A y 4B	Muestran la agrupación sostenida de pMHC-NP en células T afines con microscopía electrónica de barrido (SEM).
5	Figura 4A	Muestra imágenes 3D SEM de células T 8.3-CD8 ⁺ en ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de NRP-V7/Kd-PF-M. Ampliación 100,000X; Barra: 500 nm. Las líneas discontinuas negras corresponden a clústers representativos de pMHC-NP.
10	Figura 4B	Muestra el análisis espectral EDS. Tres áreas representativas de membranas que contienen clústers (a-c) y libres de clústers (d-f) mostradas en una imagen SEM ampliada se analizaron mediante EDS y los datos se
15	20	

representaron como histogramas. El valor de P se obtuvo con la prueba Mann-Whitney U.

5 [0033] Figura 5

Muestra los resultados de la variabilidad entre ensayos de potencia.

[0034] Figuras 6A-6D

Muestra resultados usando un ensayo de potencia para determinar el efecto de los anticuerpos del suero y del componente anti pMHC-NP sobre la capacidad de pMHC para estimular una línea de células T. Los pMHC-NP se incubaron previamente con suero humano como se muestra en la Figura 6C y la Figura 6D, o sin, como se muestra en la Figura 6A o 6B; y posteriormente se incubó con el anticuerpo indicado o suero hiperinmune (H.I)

10

15

20

5

10

15

20

[0035] Figuras 7A-7D

Figura 7A

Figura 7B

de conejo. Cada anticuerpo se incubó con el pMHC y la célula como se indica a diluciones (de izquierda a derecha) de 1:10, 1:100 y 1:1000 para suero en la Figura 6B y la Figura 6D y relaciones molares (de izquierda a derecha) de Ab: pMHC de 1:1, 1: 4 y 1:16. Las barras indican desviación estándar.

Muestran citometría de flujo de células JURMA marcadas con GFP que expresan un TCR específico para DR acoplado con el polipéptido IGRP13-25.

Muestra la línea celular por sí misma.

Muestra la línea celular incubada con PE marcado con DR3 IGRP13-25 hecho por tecnología estándar de

		dimerización con cierre de leucina.
	Figura 7C	Muestra la línea celular incubada con PE marcado con DR3 IGRP13-25 hecho usando tecnología de dimerización de botón en ojal y trampa cys, que carece de un cierre de leucina.
5		
10	Figura 7D	Muestra la línea celular incubada con heterodímeros MHC de clase II marcados con PE irrelevantes.
15	[0036] Figuras 8A y 8B	Muestran la estimulación de células JURMA que expresan un TCR específico para DR acoplado con el polipéptido IGRP13-25 conjugado con una nanopartícula.
20		

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0037] Un aspecto, descrito aquí, trata de una composición que comprende: (a) al menos una célula que comprende (i) un

receptor de células T recombinante (TCR) que comprende una cadena de TCR alfa y una cadena de TCR beta; y (ii) un marcador dependiente de la vía del receptor de células T, en el que el TCR recombinante es específico para un antígeno relevante para la enfermedad unido a una molécula de histocompatibilidad (MHC) principal; y (b) una nanomedicina, que comprende un antígeno relevante para la enfermedad unido a una molécula de MHC acoplada a una nanopartícula.

[0038] En otro aspecto, descrito aquí, es una célula que comprende un receptor de células T recombinante (TCR) y un marcador dependiente de la vía del receptor de células T, en el que el receptor de células T recombinante es específico para un antígeno relevante para la enfermedad unido a complejo mayor de histocompatibilidad.

[0039] En otro aspecto descrito en el presente documento, se describe un método in vitro para medir la actividad agonista de una nanomedicina que comprende un antígeno relevante para la enfermedad unido a una molécula de MHC acoplada a una nanopartícula, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto la nanomedicina con la célula o población celular descrita en el presente documento; y (b) detectar una señal producida por el marcador dependiente de la vía del receptor de células T.

[0040] A lo largo y dentro de esta divulgación, se hace

referencia a literatura técnica y de patentes para describir más completamente el estado del arte al que se refiere esta divulgación. Algunas publicaciones se identifican con un número árabe y la información bibliográfica completa de la publicación se encuentra en la sección de referencia, inmediatamente anterior a las reivindicaciones. Todas las publicaciones se incorporan aquí como referencia para describir más completamente el estado de la técnica al que pertenece esta divulgación.

10 [0041] Debe entenderse que esta descripción no se limita a realizaciones particulares descritas, ya que tales, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente divulgación estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

20 [0042] Debe observarse que, como se usa en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "uno" y "una", incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un excipiente" incluye una pluralidad de excipientes. El término "al menos uno" pretende uno o más.

[0043] En toda esta aplicación, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar de error para el dispositivo o método que se emplea para determinar el valor. El término

5 "aproximadamente" cuando se usa antes de una designación numérica, por ejemplo, temperatura, tiempo, cantidad y concentración, incluido el rango, indica aproximaciones que pueden variar en (+) o (-) hasta en un 10%.

[0044] A menos que se defina lo contrario, todos los

10 términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia al que pertenece esta divulgación. Como se usa en este documento, los siguientes términos tienen los siguientes significados.

15 [0045] Como se usa en este documento, el término "que comprende" o "comprende" significa que las composiciones y los métodos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros. "Consistente esencialmente en" cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará excluir otros

20 elementos de cualquier importancia esencial para la combinación para el propósito establecido. Por lo tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se definen en el presente documento no excluiría otros materiales o etapas que no afecten materialmente las

características básicas y novedosas de la divulgación reivindicada, tales como composiciones para tratar o prevenir la esclerosis múltiple. "Consistente en" significará excluir más que elementos traza de otros ingredientes y pasos
5 sustanciales del método. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta divulgación.

[0046] Por "biocompatibilidad" se entiende que los componentes del sistema de administración no causarán daño
10 tisular o daño al sistema biológico humano. Para impartir biocompatibilidad, se utilizarán preferentemente polímeros y excipientes que hayan tenido un historial de uso seguro en humanos o con el estado GRAS (generalmente aceptado como seguro). Por biocompatibilidad, se entiende que los
15 ingredientes y excipientes utilizados en la composición serán finalmente "bioabsorbidos" o eliminados por el cuerpo sin efectos adversos para el cuerpo. Para que una composición sea biocompatible y se considere no tóxica, no debe causar toxicidad en las células. De manera similar, el término
20 "bioabsorbible" se refiere a nanopartículas hechas de materiales que sufren bioabsorción in vivo durante un período de tiempo tal que se evite la acumulación a largo plazo del material en el paciente. En una determinada realización, la nanopartícula biocompatible se bioabsorbe durante un período

de menos de dos años, preferiblemente menos de un año y aún más preferiblemente menos de seis meses. La velocidad de bioabsorción está relacionada con el tamaño de la partícula, el material utilizado y otros factores bien reconocidos por el experto en la materia. Se puede usar una mezcla de materiales bioabsorbibles y biocompatibles para formar los núcleos de nanopartículas utilizados en esta descripción. En una realización, se pueden combinar óxido de hierro y un polímero bioabsorbible biocompatible. Por ejemplo, el óxido de hierro y el PGLA se pueden combinar para formar una nanopartícula.

[0047] El término "complejo mayor de histocompatibilidad" o "MHC" se refiere a una molécula presentadora de antígeno en una célula inmune que tiene la capacidad de asociarse con el antígeno para formar una célula inmune asociada a antígeno. En algunas realizaciones, el MHC es una molécula de clase I o clase II. En algunas realizaciones, el MHC comprende, consiste o consiste esencialmente en proteína MHC clásica clase I, proteína MHC no clásica clase I, proteína MHC clásica clase II, proteína MHC no clásica clase II, dímeros MHC (fusiones Fc), Tetrámeros de MHC, o una forma polimérica de una proteína de MHC. El MHC se une a las moléculas de la superficie celular seleccionadas de CD4 y CD8.

[0048] Un complejo polipéptido / antígeno MHC de nanopartícula ("complejo NP" o "complejo" o "pMHC-NP" o "complejo de nanopartículas") se refiere a la presentación de un péptido, carbohidrato, lípido u otro segmento antigénico, fragmento o epítipo de una molécula o proteína antigénica (es decir, autopéptido o autoantígeno) presentada por una molécula de MHC en una superficie, como un núcleo de nanopartículas.

[0049] El "núcleo de nanopartículas" es el sustrato de nanopartículas que incluye o no capas o recubrimientos. El complejo de nanopartículas comprende el núcleo con al menos el complejo pMHC acoplado al núcleo. Los núcleos de nanopartículas pueden estar hechos de cualquiera de varios materiales y pueden ser biocompatibles.

[0050] Como se usa en el presente documento, el término "factor nuclear de células T activadas" o "NFAT" es un nombre general aplicado a una familia de factores de transcripción que se muestra que son importantes en la respuesta inmune (por ejemplo, la activación de inmunidad regulada por células T respuesta). El sistema inmunitario puede expresar uno o más miembros de la familia NFAT, que incluyen, entre otros, NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4 y NFAT5. NFATc1 a NFATc4 están regulados por la señalización de calcio. La señalización de calcio es crítica para la activación de NFAT porque la

calmodulina (CaM), una conocida proteína del sensor de calcio, activa la serina/treonina fosfatasa calcineurina (CN). La importación nuclear de proteínas NFAT se opone a las quinasas de mantenimiento en el citoplasma y las quinasas de exportación en el núcleo. Las quinasas de exportación, como PKA y GSK-3 β , deben inactivarse para la retención nuclear de NFAT. En una realización, los factores de transcripción NFAT permiten la integración y la detección de coincidencia de señales de calcio con otras vías de señalización tales como ras-MAPK o PKC.

[0051] Como se usa en el presente documento, el término "receptor de células T" o "TCR" se refiere a una molécula capaz de reconocer un péptido cuando es presentada por una molécula de MHC. En algunas realizaciones, un TCR es un heterodímero que comprende una cadena α del receptor de células T (TCR α) y una cadena β del receptor de células T (TCR β), cada cadena comprende una región variable (V) y una constante (C) región, dominio transmembrana y dominio citosólico. Las regiones V y C son generalmente homólogas a las regiones V y C de inmunoglobulina y comprenden tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Ambas cadenas de TCR están ancladas en la membrana plasmática de la célula que presenta el TCR. En algunas realizaciones, el TCR es un heterodímero que comprende la cadena γ de TCR (TCR γ) y

la cadena δ de TCR (TCR δ). En algunas realizaciones, el TCR es una construcción de TCR de cadena sencilla. Los ejemplos no limitantes de TCR α se pueden encontrar en GenBank, por ejemplo, los números de acceso de GenBank AAB31880.1, 5 AAB28318.1, AAB24428.1 y ADW95878.1, y equivalentes de cada uno de ellos. Los ejemplos no limitantes de TCR β también se pueden encontrar en GenBank, por ejemplo, los números de acceso de GenBank AAB31887.1, AKG65861.1, ADW95908.1 y AAM53411.1, y equivalentes de cada uno de ellos. En una 10 realización, la cadena γ de TCR comprende una o más secuencias encontradas en GenBank, por ejemplo, los números de acceso de GenBank AAM21533.1, DAA30449.1 y ABG91733.1, y equivalentes de cada uno de ellos. En una realización, la cadena δ de TCR comprende una o más secuencias encontradas en 15 GenBank, por ejemplo, los números de acceso de GenBank Q7YRN2.1, AAC48547.1, JC4663 y NP_001009418.1, y equivalentes de cada uno de ellos. Las TCR de cadena sencilla son conocidos en la técnica. Ejemplos no limitativos de TCR de cadena sencilla se describen en los documentos WO1996018105 y 20 US20120252742, cada uno de los cuales se incorpora como referencia en su totalidad. En una realización, el polinucleótido y las secuencias de polipéptidos de TCR β se enumeran en el Listado de Secuencias de ejemplo proporcionado a continuación y los polinucleótidos que codifican los

polipéptidos de TCR β , y equivalentes de estos polinucleótidos.

[0052] En algunas realizaciones, un TCR está asociado con CD3 y forma un complejo de señalización de cadena CD3 de
5 múltiples subunidades asociado a TCR (o el complejo TCR/CD3). En estas realizaciones, la célula se transduce con uno o más polinucleótidos que codifican un complejo TCR/CD3 formado por polipéptidos que comprenden, o que consisten
alternativamente, esencialmente, o que consisten además en
10 cadenas TCR α y β , los polipéptidos CD3 γ , δ y ϵ , y las cadenas ζ . Formando en diferentes módulos, el complejo TCR/CD3 puede llevar diferentes roles. En una realización, el complejo está implicado en el reconocimiento específico de antígeno. En estas realizaciones, el complejo está implicado
15 en la transducción de señales principalmente a través de la presencia de un motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptor ("ITAM") en las colas citoplasmáticas de las cadenas CD3 y ζ . En algunas realizaciones, el complejo TCR/CD3 está implicado en una vía de señalización de TCR
20 estimulada por un antígeno, un superantígeno o un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti receptor). En una realización, la expresión exógena del complejo TCR/CD3 facilita la vía de señalización de TCR en células CD3 negativas. Los ejemplos no limitantes de células CD3 negativas incluyen, entre otros,

BW5147 (ATCC No. TIB-472), Nk-92 (ATCC No. CRL-2407), Mino (ATCC No. PTS-CRL-3000) y JeKo-1 (ATCC No. CRL-3006).

[0053] Como se usa en el presente documento, el término "célula aislada" se refiere a la célula proporcionada para evaluar la potencia de los agentes de prueba, incluidas las nanopartículas acopladas con pMHC. En una realización, la célula es una célula de linaje T que se selecciona de JurMA, Jurkat, BW5147, HuT-78, CEM o Molt-4. Pueden ser de cualquier especie apropiada, por ejemplo, animal, mamífero, humano, canino, felino, equino, bovino u ovino. En otra realización, las células aisladas son células efectoras tales como células inmunes. En algunas realizaciones, las células efectoras expresan un receptor de células T (TCR), el complejo de cadena de múltiples unidades CD3 asociado a TCR, o un marcador dependiente de la vía TCR y un receptor CD4 o CD8. En otro aspecto, la célula también expresa un receptor para una molécula coestimuladora o una citocina. En una determinada realización, el TCR se muriniza (es decir, en el que el TCR se optimiza para interactuar con una molécula CD4 murina).

[0054] Como se usa en este documento, el término "marcador" significa un elemento en o dentro de una célula aislada que tiene una característica (por ejemplo, actividad, expresión, localización, interacción, modificación, etc.) que

es uno o más de: dependiente de, se correlaciona con, o se activa por cambios fisiológicos o condiciones de la célula. Por ejemplo, "marcador dependiente de la vía TCR" se refiere a un elemento en o dentro de las células, una característica

5 de la cual se activa o depende de la activación o modulación de la vía TCR. En algunas realizaciones, el marcador dependiente de la vía TCR se activa mediante una secuencia o promotor de ADN de unión al factor de transcripción aguas arriba (por ejemplo, una secuencia o promotor de ADN de unión

10 al factor de transcripción NFAT o un promotor o secuencia de ADN de unión al factor de transcripción NF- κ B, AP1 secuencia de ADN o promotor de unión al factor de transcripción, y secuencia o promotor de ADN de unión al factor de transcripción de IL-2). En una realización, el informe (por

15 ejemplo, marcador dependiente de la vía TCR) comprende, consiste esencialmente, o aún consiste en, un gen que codifica una proteína seleccionada del clúster que consiste en, una luciferasa, una beta lactamasa, CAT, SEAP, una proteína fluorescente, un producto génico cuantificable o la

20 combinación de los mismos.

[0055] Como se usa en el presente documento, el término "CD3" (clúster de diferenciación 3) se refiere al complejo proteico asociado con el receptor de células T. En algunas realizaciones, los anticuerpos dirigidos contra CD3 son

capaces de generar una señal de activación en linfocitos T. También se pueden usar otros ligandos de activación de células T, incluidos, sin limitación, CD28, CD134, CD137 y CD27. En algunas realizaciones, el CD3 comprende, o

5 alternativamente consiste esencialmente en, o consiste en, cuatro cadenas distintas. Para los mamíferos, las cuatro cadenas distintas son: CD3gamma, CD3delta, CD3epsilon y CD3zeta. Los ejemplos no limitantes de cadenas CD3 se pueden encontrar en GenBank, por ejemplo, los números de acceso de

10 GenBank CAA72995.1, AAI45927.1, NP_998940.1, AAB24559.1, NP_000723.1, AEQ93556.1 y EAW67366.1.

[0056] Como se usa en el presente documento, el término "CD4" (clúster de diferenciación 4) se refiere a una glucoproteína que se encuentra en la superficie de las

15 células inmunes, por ejemplo, células T auxiliares, monocitos, macrófagos y células dendríticas. En algunas realizaciones, CD4 actúa como un correceptor para el TCR y recluta la tirosina quinasa (por ejemplo, Lck). Los ejemplos no limitantes de CD4 se pueden encontrar en GenBank, por

20 ejemplo, los números de acceso de GenBank AAC36010.1, CAA72740.1, AFK73394.1, CAA60883.1 y AAH25782.1. Ejemplos de secuencias de polinucleótidos y polipéptidos de CD4 se enumeran en el Listado de Secuencias de ejemplo que se proporciona a continuación.

[0057] El término "secuencia de salto de ribosomas" se refiere a cualquier secuencia que se puede introducir entre dos o más secuencias de genes bajo el control del mismo promotor, de modo que las secuencias de genes se traducen como polipéptidos separados (es decir, se traducen como secuencias biscistrónicas o multicistrónicas) Los ejemplos de secuencia de salto de ribosomas incluyen, pero sin limitación, secuencias de péptidos 2A. En una realización, se introduce una secuencia de salto de ribosoma entre las secuencias de genes. En otra realización, se introducen dos o más secuencias de salto de ribosomas entre las secuencias de genes.

[0058] El término "secuencia de salto de ribosomas 2A" se refiere a una secuencia peptídica que comprende el motivo consenso de Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly-Pro, en el que X representa cualquier aminoácido. En una realización, la secuencia de salto de ribosomas 2A comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o todavía consiste en, teschovirus-1 2A (P2A) porcino; T2A, el virus de ésa asigna 2A (T2A); virus de rinitis equina A (ERAV) 2A (E2A); FMDV 2A (F2A), o la combinación de los mismos. Los ejemplos no limitantes de secuencias peptídicas 2A incluyen, pero son aquellas secuencias proporcionadas en el Listado de Secuencias ejemplar que se proporciona a continuación.

[0059] Las secuencias de salto de ribosomas 2A permiten la expresión de múltiples genes en un vector de expresión. Por ejemplo, un vector de expresión con la secuencia de salto del ribosoma 2A puede expresar las cuatro proteínas que
5 forman el complejo CD3. En una realización, la secuencia de la región codificante ejemplar no limitante del vector de expresión se enumera en el Listado de Secuencias ejemplares se proporciona a continuación como: secuencia polinucleotídica de CD3delta-F2A-gamma-T2A-epsilon-P2A-zeta
10 murina y secuencia polipeptídica de CD3delta-F2A-gamma-T2A-epsilon-P2A-zeta murina, y equivalentes de cada uno de ellos.

[0060] En otro aspecto, un vector de expresión con la secuencia de salto de ribosomas 2A puede expresar múltiples subunidades de TCR. En algunas realizaciones, las secuencias
15 de región de codificación ejemplares no limitantes del vector de expresión se proporcionan en las SEQ ID NO: 527 a 531 (IGRP13-25 TCR), 533 a 537 (IGRP13-25 TCR murinizado), 538 a 542 (PPI76 -90 TCR), o 543 a 547 (BDC 2.5 TCR).

[0061] El término "secuencia IRES" o "secuencia interna
20 del sitio de entrada al ribosoma" se refiere a una secuencia de nucleótidos que permite el inicio de la traducción en el medio de una secuencia de ARN. En algunas realizaciones, la inserción de una secuencia IRES entre dos secuencias de genes (por ejemplo, Marcos de lectura abiertos del marcador) puede

conducir la traducción de la región codificante de la proteína aguas abajo independientemente de la estructura de 5'cap unida al extremo 5' de la molécula de ARNm. Secuencias IRES adecuadas son conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, las secuencias IRES derivan de poliovirus, rinovirus, virus de encefalomiocarditis, virus de la fiebre aftosa, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis C, virus de la peste porcina clásica y virus de la diarrea viral bovina. Se pueden encontrar ejemplos no limitantes de secuencias IRES en www.iresite.org, que se incorpora como referencia en su totalidad. Los ejemplos no limitantes de secuencias IRES se proporcionan en las SEQ ID NO: 524 a 526, e incluyen, pero no se limitan a: secuencia IRES EMCV, secuencia IRES pBag1 y secuencia IRES sintética, y equivalentes de cada una de ellas.

[0062] El término "luciferasa" significa una proteína que puede catalizar una reacción bioluminiscente. Por ejemplo, una luciferasa como enzima puede producir una señal cuando se le proporciona un sustrato (por ejemplo, luciferina, aldehído de cadena larga o colentrazina), una fuente de energía (por ejemplo, ATP) y oxígeno. Las secuencias de luciferasa adecuadas para esta descripción son conocidas en la técnica. En una realización, el gen de luciferasa es de la luciérnaga (por ejemplo, Photinus

pyralis). Los ejemplos no limitantes de secuencias de luciferasa se pueden ubicar en GenBank (por ejemplo, los números de acceso de GenBank AAR20792.1, AAL40677.1, AAL40676.1 y AAV35379.1, y equivalentes de cada uno de ellos.

5 El sistema marcador de luciferasa está disponible comercialmente (por ejemplo, Promega Cat.# E1500 o E4550). Los polinucleótidos ejemplares que codifican una proteína luciferasa y el polipéptido se proporcionan en las SEQ ID NO: 555 y 556, como se proporciona a continuación.

10 [0063] El término "beta lactamasa" se refiere a una enzima o proteína que puede descomponer un anillo de beta-lactama. En una realización, la beta lactamasa es una enzima producida por bacterias, que puede hidrolizar el anillo de betalactámico en un antibiótico betalactámico, parcial o

15 completamente. Se pueden encontrar ejemplos no limitantes de secuencias de beta lactamasa en GenBank (por ejemplo, los números de acceso de GenBank AMM70781.1, CAA54104.1 y AAA23441.1, y equivalentes de cada uno de ellos), consultado por última vez el 12 de enero de 2017.

20 [0064] El término "cloranfenicol acetiltransferasa" o "CAT" se refiere a una enzima o proteína que puede transferir un clúster acetilo de la coenzima A acetilada a cloranfenicol o un derivado relacionado. Se pueden encontrar ejemplos no limitantes de "CAT" en GenBank (por ejemplo, No. De acceso

OCR39292.1, WP_072643749.1, CUB58229.1 y KIX82948.1, y equivalentes de cada uno de ellos), consultado por última vez el 12 de enero de 2017 Los ensayos de CAT están disponibles comercialmente (por ejemplo, FAST CAT® Kit de ensayo de cloranfenicol acetiltransferasa (F-2900) de Thermal Fisher).

[0065] El término "fosfatasa alcalina embrionaria secretada" o "SEAP" se refiere a una enzima codificada por un gen SEAP (por ejemplo, GenBank Acceso No. NP 001623 y sus equivalentes, último acceso el 12 de enero de 2017), que se utiliza como un marcador para estudiar la actividad promotora o la expresión génica. Los ejemplos no limitantes de secuencias SEAP se pueden ubicar en GenBank (por ejemplo, los números de acceso de GenBank ADV10306.1, AAB64404.1, EEB84921.1 y EFD70636.1, y equivalentes de cada uno de ellos), consultado por última vez el 12 de enero de 2017 La actividad SEAP se puede medir con un luminómetro (por ejemplo, El luminómetro de microplacas Veritas de Turner BioSystems de Promega).

[0066] El término "proteína fluorescente" se refiere a cualquier proteína capaz de emitir luz cuando se excita con radiación electromagnética apropiada, y que tiene una secuencia de aminoácidos que es natural o modificada y se deriva de la secuencia de aminoácidos de fluorescentes relacionados con proteína Aequorea. La luz emisora de la

proteína fluorescente puede determinarse mediante lectores fluorescentes (por ejemplo, lector de microplacas de fluorescencia FL600). Ejemplos no limitantes de proteína fluorescente incluyen proteína verde (GFP), proteína fluorescente verde mejorada (eGFP), proteína fluorescente azul (BFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente cian (CFP), proteína fluorescente roja (RFP), o cualquier otra proteína fluorescente adecuada, o combinación de las mismas, o partes fluorescentes o derivados de las mismas. Las secuencias de proteínas fluorescentes se pueden ubicar en GenBank (por ejemplo, Los números de acceso de GenBank AFA52654.1, ACS44348.1 y AAQ96629.1, y equivalentes de cada uno de ellos), consultados por última vez el 12 de enero de 2017. están disponibles comercialmente (por ejemplo, TakaRa Cat.# 631089).

[0067] "Bajo control transcripcional" es un término bien entendido en la técnica e indica que la transcripción de una secuencia de polinucleótidos, generalmente una secuencia de ADN, depende de que esté unida operativamente a un elemento que contribuya al inicio de, o promueva, la transcripción. "Operativamente unido" pretende que los polinucleótidos estén dispuestos de una manera que les permita funcionar en una célula.

[0068] El término "codificar" tal como se aplica a los

polinucleótidos se refiere a un polinucleótido que se dice que "codifica" un polipéptido si, en su estado nativo o cuando es manipulado por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, puede ser transcrito o traducido para producir el ARNm para el polipéptido o un fragmento del mismo. La cadena antisentido es el complemento de dicho ácido nucleico, y la secuencia codificante se puede deducir de ella.

[0069] El término "promotor" se refiere a una región de ADN que inicia la transcripción de un gen particular. El promotor incluye el promotor central, que es la porción mínima del promotor requerida para iniciar correctamente la transcripción y también puede incluir elementos reguladores tales como sitios de unión del factor de transcripción. Los elementos reguladores pueden promover la transcripción o inhibir la transcripción. Los elementos reguladores en el promotor pueden ser sitios de unión para activadores transcripcionales o represores transcripcionales. Un promotor puede ser constitutivo o inducible. Un promotor constitutivo se refiere a uno que siempre está activo o dirige constantemente la transcripción de un gen por encima de un nivel basal de transcripción. Ejemplos no limitativos de tales incluyen el promotor de fosfoglicerato quinasa 1 (PGK); SSFV, CMV, MNDU3, SV40, Efla, UBC y CAGG. Un promotor

inducible es uno que puede ser inducido por una molécula o un factor agregado a la célula o expresado en la célula. Un promotor inducible aún puede producir un nivel basal de transcripción en ausencia de inducción, pero la inducción típicamente conduce a una producción significativamente mayor de la proteína.

[0070] Un potenciador es un elemento regulador que aumenta la expresión de una secuencia diana. Un "promotor/potenciador" es un polinucleótido que contiene secuencias capaces de proporcionar funciones tanto de promotor como de potenciador. Por ejemplo, las repeticiones terminales largas de retrovirus contienen funciones promotoras y potenciadoras. El potenciador/promotor puede ser "endógeno" o "exógeno" o "heterólogo". Un potenciador/promotor "endógeno" es uno que está naturalmente ligado con un gen dado en el genoma. Un potenciador/promotor "exógeno" o "heterólogo" es uno que se coloca en yuxtaposición a un gen mediante manipulación genética (es decir, técnicas de biología molecular) de modo que la transcripción de ese gen dirigido por el potenciador/promotor vinculado. Los polinucleótidos de esta descripción opcionalmente comprenden una secuencia potenciadora.

[0071] Como se usa en el presente documento, el término "promotor de NFAT", "secuencia de ADN de unión al factor de

transcripción de NFAT" o "factor nuclear del promotor de células T activadas" se refiere a una secuencia que comprende, que consiste esencialmente en, o que todavía consiste en, uno o más Elementos NFAT. En una realización, la

5 unión de un promotor de NFAT por un factor de transcripción de NFAT (por ejemplo, NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4 o NFAT5) aumenta o promueve la transcripción de secuencias posteriores (por ejemplo, un marcador). Las secuencias promotoras de NFAT están generalmente en GenBank, que incluyen, entre otras, las

10 siguientes secuencias de GenBank en los números de acceso DQ904462.1, KX591058.1, AF480838.1 y equivalentes de cada uno de ellos, o una secuencia con al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% de identidad de los mismos.

[0072] Como se usa en el presente documento, el término

15 "promotor AP-1" o "secuencia de ADN de unión al factor de transcripción AP-1" se refiere a una secuencia que comprende, o que consiste alternativamente esencialmente, o que consiste además en uno o más AP-1 elementos de activación transcripcional. En una realización, la unión de un promotor

20 AP-1 por un factor de transcripción AP-1 aumenta o promueve la transcripción de secuencias posteriores (por ejemplo, un marcador como luciferasa o CAT). El promotor AP-1 puede derivar de humanos, ratones, ratas, peces cebra, moscas o cualquier otra especie. En una realización, el promotor AP-1

tiene una secuencia de ATGAGTCAT y sus equivalentes, o una secuencia con al menos una secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% identidad equivalente a ATGAGTCAT.

[0073] Como se usa en el presente documento, el término

5 "promotor de NF- κ B" o "secuencia de ADN de unión al factor de transcripción de NF- κ B" se refiere a una secuencia que comprende, o que consiste alternativamente esencialmente, o que consiste además en uno o más NF- κ B elementos. En una realización, la unión de factores de transcripción Rel/NF- κ B,

10 ya sea como homodímero o heterodímero, al promotor NF- κ B aumenta o inicia la transcripción de secuencias posteriores (por ejemplo, un marcador como luciferasa o CAT). Algunas realizaciones del promotor de NF- κ B o sitio de unión se describen en la Patente de Estados Unidos No. 8.299.237, que

15 se incorpora como referencia en su totalidad.

[0074] Como se usa en el presente documento, el término

"promotor de IL-2" o "secuencia de ADN de unión al factor de transcripción de IL-2" se refiere a una secuencia que comprende, o que consiste alternativamente esencialmente, o

20 que consiste además en uno o más IL-2 Elementos de activación transcripcional que responden a la simulación de células T. En una realización, la unión de factores de transcripción al promotor de IL-2 aumenta o inicia la transcripción de secuencias posteriores (por ejemplo, un marcador como

luciferasa o CAT). En una realización, el promotor de IL-2 deriva de humanos, ratones, ratas o peces cebra. Algunas secuencias promotoras de IL-2 ejemplares no limitantes son accesibles desde GenBank en los números de acceso AJ006884.1, EF397241.1, AB041341.1, KU058846.1, EF457240.1 y HM802330.1, y equivalentes de cada uno de ellos. consultado el 12 de enero de 2017.

[0075] Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a un ácido nucleico no cromosómico que comprende un replicón intacto de modo que el vector puede replicarse cuando se coloca dentro de una célula, por ejemplo, mediante un proceso de transformación. Los vectores pueden ser virales o no virales. Los vectores virales incluyen retrovirus, lentivirus, adenovirus, herpesvirus, baculovirus, baculovirus modificados, papovirus o virus modificados de forma natural. Los ejemplos de vectores no virales para administrar ácido nucleico incluyen ADN desnudo; ADN acoplado con lípidos catiónicos, solos o en combinación con polímeros catiónicos; liposomas aniónicos y catiónicos; complejos y partículas de ADN-proteína que comprenden ADN condensado con polímeros catiónicos tales como polilisina heterogénea, oligopéptidos de longitud definida y polietilenimina, en algunos casos contenidos en liposomas; y el uso de complejos ternarios que comprenden un virus y

polilisina-ADN.

[0076] Un "vector viral" se define como un virus o partícula viral producida de forma recombinante que comprende un polinucleótido para ser entregado en una célula huésped, ya sea in vivo, ex vivo o in vitro. Los ejemplos de vectores virales incluyen vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados, vectores de alfavirus y similares. Los vectores de alfavirus, como los vectores basados en el virus Semliki Forest y los vectores basados en el virus Sindbis, también se han desarrollado para su uso en terapia génica e inmunoterapia. Ver, Schlesinger y Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotecnología 5: 434-439 y Ying, et al. (1999) Nat. Medicina. 5 (7): 823-827.

[0077] En aspectos donde la transferencia de genes está mediada por un vector lentiviral, una construcción de vector se refiere al polinucleótido que comprende el genoma lentiviral o parte del mismo, y un gen terapéutico. Como se usa en el presente documento, "transferencia de genes mediada por lentivirales" o "transducción lentiviral" tiene el mismo significado y se refiere al proceso por el cual un gen o secuencias de ácido nucleico se transfieren de manera estable a la célula huésped en virtud de que el virus ingresa a la célula e integra su genoma en el genoma de la célula huésped.

El virus puede ingresar a la célula huésped a través de su mecanismo normal de infección o modificarse de modo que se una a un receptor o ligando de la superficie de la célula huésped diferente para ingresar a la célula. Los retrovirus

5 llevan su información genética en forma de ARN; sin embargo, una vez que el virus infecta una célula, el ARN se transcribe inversamente en la forma de ADN que se integra en el ADN genómico de la célula infectada. La forma de ADN integrada se llama provirus. Como se usa en el presente documento, el

10 vector lentiviral se refiere a una partícula viral capaz de introducir ácido nucleico exógeno en una célula a través de un mecanismo de entrada viral o de tipo viral. Un "vector lentiviral" es un tipo de vector retroviral bien conocido en la técnica que tiene ciertas ventajas en la transducción de

15 células no divisorias en comparación con otros vectores retrovirales. Ver, Trono D. (2002) Lentiviral vectors, New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

[0078] Los vectores lentivirales de esta invención se basan o derivan de oncoretrovirus (el subclúster de

20 retrovirus que contienen MLV) y lentivirus (el subclúster de retrovirus que contienen VIH). Los ejemplos incluyen ASLV, SNV y RSV, todos los cuales se han dividido en componentes de empaquetamiento y vectores para sistemas de producción de partículas de vectores lentivirales. La partícula del vector

lentiviral según la invención puede basarse en una versión alterada genéticamente o de otro modo (por ejemplo, por elección específica del sistema celular de empaquetamiento) de un retrovirus particular.

- 5** [0079] Que la partícula del vector de acuerdo con la invención esté "basada en" un retrovirus particular significa que el vector se deriva de ese retrovirus particular. El genoma de la partícula del vector comprende componentes de ese retrovirus como columna vertebral. La partícula del
- 10** vector contiene componentes esenciales del vector compatibles con el genoma de ARN, incluidos los sistemas de transcripción inversa e integración. Por lo general, estos incluirán proteínas gag y pol derivadas del retrovirus particular. Por lo tanto, la mayoría de los componentes estructurales de la
- 15** partícula del vector normalmente se derivarán de ese retrovirus, aunque pueden haberse alterado genéticamente o de otro modo para proporcionar las propiedades útiles deseadas. Sin embargo, ciertos componentes estructurales y, en particular, las proteínas env, pueden originarse a partir de
- 20** un virus diferente. El rango de hospedadores del vector y los tipos de células infectados o transducidos pueden alterarse usando diferentes genes env en el sistema de producción de partículas del vector para dar a la partícula del vector una especificidad diferente.

[0080] Como se usa en este documento, el término "Jurkat" se refiere a una línea celular de linfocitos humanos. Existen diferentes tipos de células Jurkat. En una realización, la célula Jurkat es capaz de producir IL-2. La
5 célula Jurkat está disponible comercialmente o desde un repositorio de línea celular (por ejemplo, ATCC No. TIB-152), y allí se describen métodos y composiciones para cultivar la célula.

[0081] Como se usa en el presente documento, el término
10 "JurMa" o "Jurkat/MA" se refiere a una línea celular Jurkat que carece de expresión de TCR endógeno. El Dr. Erik Hooijberg Vrije estableció una realización de las células JurMa en la Universiteit Medisch Centrum, Amsterdam (ver Asai et al., PLoS One. 8 (2): e56820 (2013), último acceso el 12
15 de enero de 2017.

[0082] Como se usa en el presente documento, el término "BW5147" se refiere a una línea celular de linfocitos, que puede usarse para estudiar la función de las células T. En algunas realizaciones, las células BW5147 derivan del
20 linfoma. Hay muchos tipos de células BW5147, que están disponibles comercialmente o desde un repositorio de líneas celulares (por ejemplo, ATCC No. TIB-472), y allí se describen métodos y composiciones para cultivar la célula.

[0083] Como se usa en el presente documento, el término

"HuT-78" se refiere a una línea celular de linfocitos. En una realización, el HuT-78 es una línea celular de linfoma de células T. Las células HuT-78 están disponibles comercialmente (por ejemplo, Sigma-Aldrich) o en un depósito de línea celular (por ejemplo, ATCC No. TIB-161), y los métodos y composiciones para cultivar la célula se describen allí.

[0084] Como se usa en el presente documento, el término "CEM" se refiere a una línea celular de linfocitos. En una realización, la célula CEM es una célula linfoblástica de sangre periférica. Las células CEM están disponibles en un repositorio de línea celular (por ejemplo, ATCC Nos. CRL-2265 o CCL-119), y en él se describen métodos y composiciones para cultivar la célula.

[0085] Como se usa en este documento, el término "Molt-4" se refiere a una línea celular de linfocitos. En una realización, la célula Molt-4 es una célula de leucemia linfoblástica aguda. Las células Molt-4 están disponibles comercialmente (por ejemplo, Sigma-Aldrich) o en un depósito de línea celular (por ejemplo, ATCC N°CRL-1582), y en él se describen métodos y composiciones para cultivar la célula.

[0086] La "valencia" se refiere al número de pMHC por núcleo de nanopartículas, o coestimuladores por nanopartículas, o citocinas por núcleo de nanopartículas.

[0087] La "densidad" cuando se refiere a pMHC por núcleo de nanopartículas, o coestimuladores por nanopartículas, o citocinas por núcleo de nanopartículas se calcula como el área de superficie del núcleo de nanopartículas con capas
 5 externas, que también pueden incluir conectores. El área de superficie es el área de superficie total disponible de la construcción utilizada.

[0088] "Antígeno" como se usa en el presente documento se refiere a todo, parte, fragmento o segmento de una
 10 molécula que puede inducir una respuesta inmune en un sujeto o una expansión de una célula inmune, preferiblemente una célula T o B. En un aspecto, el antígeno es un antígeno relevante para el cáncer. En otro aspecto, el antígeno es un antígeno relevante del trastorno autoinmune. En otro aspecto,
 15 el antígeno es un alérgeno.

[0089] El término "alquilo" se refiere a clústers hidrocarbilo alifáticos saturados monovalentes que tienen de 1 a 10 átomos de carbono (es decir, alquilo C1-C10) o de 1 a 6 átomos de carbono (es decir, alquilo C1-C6), o de 1 a 4
 20 carbonos. Este término incluye, a modo de ejemplo, clústers hidrocarbilo lineales y ramificados tales como metilo (CH₃-), etil (CH₃CH₂-), n-propil (CH₃CH₂CH₂-), isopropil ((CH₃)₂CH-), n-butil (CH₃CH₂CH₂CH₂-), isobutil ((CH₃)₂CHCH₂-), sec-butil ((CH₃)(CH₃CH₂)CH-), t-butil

((CH₃)₃C-), n-pentil (CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂-), y neopentil ((CH₃)₃CCH₂-).

[0090] El término "alcoxi" se refiere a -O-alquilo.

[0091] Un "imitador" es un análogo de un ligando o
 5 péptido dado, en el que el análogo es sustancialmente similar al ligando. "Sustancialmente similar" significa que el análogo tiene un perfil de unión similar al ligando, excepto que la mímica tiene uno o más clústers funcionales o modificaciones que en conjunto representan menos del 50%,
 10 menos del 40%, menos del 30%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 10% o menos de aproximadamente 5% del peso molecular del ligando.

[0092] Las "células inmunes" incluyen, por ejemplo, glóbulos blancos (leucocitos) que se derivan de células madre
 15 hematopoyéticas (HSC) producidas en la médula ósea, linfocitos (células T, células B, células asesinas naturales (NK)) y Células derivadas de mieloides (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas). Como se usa en este documento, el término
 20 "célula B" se refiere a un tipo de linfocito en la inmunidad humoral del sistema inmune adaptativo. Las células B funcionan principalmente para producir anticuerpos, sirven como células presentadoras de antígenos, liberan citocinas y desarrollan células B de memoria después de la activación por

interacción antigénica. Las células B se distinguen de otros linfocitos, como las células T, por la presencia de un receptor de células B en la superficie celular. Como se usa en este documento, el término "célula T" se refiere a un tipo

5 de linfocito que madura en el timo. Las células T juegan un papel importante en la inmunidad celular y se distinguen de otros linfocitos, como las células B, por la presencia de un receptor de células T en la superficie celular. Las células T pueden aislarse u obtenerse de una fuente disponible

10 comercialmente. La "célula T" incluye todos los tipos de células inmunes que expresan CD3, incluidas las células T auxiliares (células CD4+), las células T citotóxicas (células CD8+), las células T asesinas naturales, las células T reguladoras (Treg) y las células T gamma-delta. Una "célula

15 citotóxica" incluye las células T CD8+, las células asesinas naturales (NK) y los neutrófilos, que son capaces de mediar las respuestas de citotoxicidad.

[0093] El término "células T efectoras", como se usa en el presente documento, se refiere a células T que pueden

20 unirse específicamente a un antígeno y mediar una respuesta inmune (función efectora) sin la necesidad de una diferenciación adicional. Los ejemplos de células T efectoras incluyen CTL, células TH1, células TH2, células efectoras de memoria y células T auxiliares. A diferencia de las células T

efectoras, las células T vírgenes no han encontrado su antígeno específico, complejo MHC, ni respondieron a él mediante proliferación y diferenciación en una célula T efectora. Las células T efectoras pueden estar en reposo (en
5 la fase G0 del ciclo celular) o activadas (proliferando).

[0094] El término "célula T autorreactiva antipatógena" se refiere a una célula T con propiedades antipatógenas (es decir, células T que contrarrestan una enfermedad autoinmune tal como EM, una enfermedad o trastorno relacionado con EM o
10 prediabetes). Estas células T pueden incluir células T antiinflamatorias, células T de memoria central, células T efectoras de memoria, células T de memoria, células T de baja avidéz, células T auxiliares, células T autorreguladoras, células T citotóxicas, células T asesinas naturales, células
15 T reguladoras, células T TR1, células T supresoras, células T CD4+, células T CD8+ y similares.

[0095] El término "célula T antiinflamatoria" se refiere a una célula T que promueve una respuesta antiinflamatoria. La función antiinflamatoria de las células T se puede lograr
20 mediante la producción o secreción de proteínas antiinflamatorias, citocinas, quimiocinas y similares. Las proteínas antiinflamatorias también pretenden abarcar señales antiproliferativas que suprimen las respuestas inmunitarias. Las proteínas antiinflamatorias incluyen IL-4, IL-10, IL-13,

IL-21, IL-23, IL-27, IFN- α , TGF- β , IL-1ra, G-CSF y receptores solubles para TNF e IL-6.

[0096] El término "diferenciado" se refiere a cuando una célula de un primer tipo es inducida a convertirse en una
5 célula de un segundo tipo. En algunas realizaciones, una célula T asociada se diferencia en una célula TR1 reguladora. En algunas realizaciones, una célula T activada se diferencia en una célula TR1. En algunas realizaciones, una célula T de memoria se diferencia en una célula TR1. En algunas
10 realizaciones, una célula B se diferencia en una célula B reguladora.

[0097] Como se usa en este documento, "botón en ojal" se refiere a una arquitectura de polipéptido que requiere una protuberancia (o "botón") en una interfaz de un primer
15 polipéptido y una cavidad correspondiente (o un "ojal") en una interfaz de un segundo polipéptido, de modo que la protuberancia se puede colocar en la cavidad para promover la formación de heteromultímeros. Las protuberancias se construyen reemplazando pequeñas cadenas laterales de
20 aminoácidos de la interfaz del primer polipéptido con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, fenilalanina o tirosina). Las cavidades de tamaño idéntico o similar a las protuberancias se crean en la interfaz del segundo polipéptido reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos

grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Las protuberancias y cavidades se pueden hacer por medios sintéticos tales como alterando el ácido nucleico que codifica los polipéptidos o por síntesis de péptidos, utilizando métodos de rutina por un experto en la materia. En algunas realizaciones, la interfaz del primer polipéptido está ubicada en un dominio Fc en el primer polipéptido; y la interfaz del segundo polipéptido se encuentra en un dominio Fc en el segundo polipéptido. Los heteromultímeros de botón en el ojal y los métodos de su preparación y uso se describen en las patentes estadounidenses números 5.731.168; 5.807.706; 5.821.333; 7.642.228; 7.695.936; 8.216.805; y 8.679.785, todas las cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

[0098] Como se usa en el presente documento, "MHC-alfa-Fc/MHC-beta-Fc" se refiere a un heterodímero que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en el que el primer polipéptido comprende una cadena α de MHC de clase II y un dominio Fc de anticuerpo; el segundo polipéptido comprende una cadena β de MHC de clase II y un dominio Fc de anticuerpo. Un botón en ojal MHC-alfa-Fc/MHC-beta-Fc requiere además que los dominios Fc de cada polipéptido interactúen entre sí a través del posicionamiento complementario de una protuberancia en un dominio Fc dentro

de la cavidad correspondiente en el otro dominio Fc.

[0099] El término "aislado" significa separado de los constituyentes, celulares y de otro tipo, con los que el polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o

5 fragmento (s) de los mismos, normalmente están asociados en la naturaleza. Por ejemplo, con respecto a un polinucleótido, un polinucleótido aislado es uno que está separado de las secuencias 5' y 3' con las que normalmente está asociado en el cromosoma. Como es evidente para los expertos en la

10 materia, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento (s) de origen no natural no requiere "aislamiento" para distinguirlo de su contraparte natural. Además, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento (s) "concentrado", "separado" o

15 "diluido" se distingue de su contraparte natural en que la concentración o el número de moléculas por volumen es mayor que "concentrado" o menor que "separado" que el de su contraparte natural. Un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento (s) del mismo, que difiere

20 de la contraparte natural en su secuencia primaria o, por ejemplo, por su patrón de glicosilación, no necesita estar presente en su forma aislada ya que es distinguible de su contraparte natural por su secuencia primaria, o alternativamente, por otra característica como su patrón de

glicosilación. Una célula de mamífero, como la célula T, se aísla si se extrae del sitio anatómico en el que se encuentra en un organismo.

[0100] Una "célula T autorreactiva" es una célula T que
5 reconoce un "antígeno automático", que es una molécula producida y contenida por el mismo individuo que contiene la célula T.

[0101] Una "célula T patógena" es una célula T que es perjudicial para un sujeto que contiene la célula T, mientras
10 que una célula T no patógena no es sustancialmente perjudicial para un sujeto, y una célula T antipatógena reduce, mejora, inhibe o niega el daño de una célula T patógena.

[0102] Como se usa en el presente documento, los
15 términos células B reguladoras o células B reguladoras ("B-regs") se refieren a aquellas células que son responsables del efecto antiinflamatorio que se caracteriza por la expresión de CD1d y CD5 y la secreción de IL-10. Los B-reg también se identifican mediante la expresión de Tim-1 y
20 pueden inducirse mediante la ligadura de Tim-1 para promover la tolerancia. Se demostró que la capacidad de los B-regs está impulsada por muchos factores estimuladores, como los receptores tipo Toll, el ligando CD40 y otros. Sin embargo, la caracterización completa de B-regs está en curso. Los

registros B también expresan altos niveles de CD25, CD86 y TGF- β . Este subconjunto de células B puede suprimir la proliferación de Th1, contribuyendo así al mantenimiento de la autotolerancia. La potenciación de la función B-reg debería convertirse en el objetivo de muchos medicamentos inmunomoduladores, contribuyendo a un mejor control de las enfermedades autoinmunes. Ver, por ejemplo: ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707422, último acceso el 31 de octubre de 2013.

- 10** [0103] Las células T Reguladoras Tipo-1 (TR1) son un subconjunto de células T CD4+ que tienen propiedades reguladoras y pueden suprimir las respuestas inmunes específicas de antígeno in vitro e in vivo. Estas células TR1 se definen por su perfil único de producción de citoquinas y
- 15** producen altos niveles de IL-10 y TGF-beta, pero no IL-4 o IL-2. La IL-10 y el TGF-beta producidos por estas células median la inhibición de las células T vírgenes primarias in vitro. También hay evidencia de que las células TR existen in vivo, y se ha documentado la presencia de células T CD4 (+)
- 20** con alta producción de IL-10 en pacientes con inmunodeficiencia combinada severa que han recibido trasplantes alogénicos de células madre. Las células TR1 están involucradas en la regulación de la tolerancia periférica, y podrían usarse potencialmente como terapia

celular para modular las respuestas inmunes in vivo. Ver, por ejemplo: ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10887343, último acceso el 31 de octubre de 2013.

[0104] Las células TR1 se definen por su capacidad para
5 producir altos niveles de IL-10 y TGF-beta. Las células Tr1 específicas para una variedad de antígenos surgen in vivo, pero también pueden diferenciarse de las células T CD4+ vírgenes en presencia de IL-10 in vitro. Las células TR1 tienen una baja capacidad proliferativa, que puede ser
10 superada por IL-15. Las células TR1 suprimen las respuestas ingenuas de tipo 1 o 2 de ayuda T de memoria mediante la producción de IL-10 y TGF-beta. La caracterización adicional de las células TR1 a nivel molecular definirá sus mecanismos de acción y aclarará su relación con otros subconjuntos de
15 células TR. Se puede prever el uso de células TR1 para identificar nuevos objetivos para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, y como una terapia celular para modular la tolerancia periférica. Ver, por ejemplo, ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11722624, consultado por última vez
20 el 31 de octubre de 2013.

[0105] Una "cantidad efectiva" es una cantidad suficiente para lograr el propósito pretendido; Los ejemplos no limitativos de tales incluyen la complejación de los receptores de células T, el inicio de la respuesta inmune, la

modulación de la respuesta inmune, la supresión de una respuesta inflamatoria y la modulación de la actividad de las células T o las poblaciones de células T. En una realización, la cantidad efectiva es una que es suficiente para estimular la vía TCR de una célula diana. En un aspecto, la cantidad efectiva es aquella que funciona para lograr un propósito terapéutico establecido, es decir, una cantidad terapéuticamente efectiva o para proporcionar una respuesta medible. Como se describe aquí en detalle, la cantidad o dosis efectiva depende del propósito y la composición y puede determinarse de acuerdo con la presente descripción.

[0106] Una cantidad efectiva de composición terapéutica se determina en base al objetivo pretendido. El término "dosis unitaria" o "dosificación" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para su uso en un sujeto, cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de la composición calculada para producir las respuestas deseadas discutidas anteriormente en asociación con su administración, es decir, la vía apropiada y régimen. La cantidad a administrar, de acuerdo con el número de tratamientos y la dosis unitaria, depende del resultado o protección deseada. Las cantidades precisas de la composición también dependen del juicio del profesional y son propias de cada individuo. Los factores que afectan la dosis incluyen el estado físico y

clínico del sujeto, la vía de administración, el objetivo previsto del tratamiento (alivio de los síntomas versus la cura) y la potencia, estabilidad y toxicidad de la composición particular. Tras la formulación, las soluciones
5 se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéutica o profilácticamente efectiva. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente.

10 [0107] Un "multímero de MHC" como se usa el término en el presente documento significa un complejo de dos o más, usualmente cuatro, o hasta aproximadamente cincuenta o más monómeros de MHC.

[0108] Como se usa en el presente documento, un
15 "complejo multimérico" se refiere a un complejo entre una población celular diana y uno o más complejos pMHC, en el que la proteína MHC del complejo pMHC comprende la forma multimérica de la proteína MHC. En algunas realizaciones, la forma multimérica de la proteína MHC incluye un dímero, un
20 trímero, un tetrámero, un pentámero o un dextramero.

[0109] Como se usa en este documento, la frase "respuesta inmune" o su "respuesta inmunológica" equivalente se refiere al desarrollo de una respuesta mediada por células (mediada por células T específicas de antígeno o sus

productos de secreción). La presentación de epítomos de polipéptidos en asociación con moléculas de MHC de clase I o clase II provoca una respuesta inmune celular para tratar o prevenir una infección viral o expandir células Breg

5 específicas de antígeno, células auxiliares T TC1, CD4+ o citotóxico CD8+ Células T o enfermedades generadas, células T "autorreguladoras" de células T y células autorreguladoras. La respuesta también puede implicar la activación de otros componentes. En algunos aspectos, el término "respuesta

10 inmune" puede usarse para abarcar la formación de una red reguladora de células inmunes. Por lo tanto, el término "formación de red reguladora" puede referirse a una respuesta inmune provocada de tal manera que una célula inmunitaria, preferiblemente una célula T, más preferiblemente una célula

15 reguladora T, desencadena una mayor diferenciación de otras células inmunes, que incluyen, pero no se limitan a, B células o células presentadoras de antígeno, cuyos ejemplos no limitantes incluyen células dendríticas, monocitos y macrófagos. En ciertas realizaciones, la formación de la red

20 reguladora implica que las células B se diferencien en células B reguladoras; en ciertas realizaciones, la formación de la red reguladora implica la formación de células presentadoras de antígeno tolerogénicas.

[0110] Como se usa en el presente documento,

"nanoesfera", "NP" o "nanopartícula" significa una partícula pequeña y discreta que se administra singularmente o en plural a un sujeto, muestra celular o muestra de tejido, según corresponda. En ciertas realizaciones, el término

5 "nanopartícula" como se usa en el presente documento incluye cualquier capa alrededor del núcleo de nanopartícula y, por lo tanto, incluye el núcleo con y sin una capa tal como una capa de enlace. En ciertas realizaciones, las nanopartículas tienen una forma sustancialmente esférica. En ciertas

10 realizaciones, la nanopartícula no es un liposoma o una partícula viral. En realizaciones adicionales, la nanopartícula se compone de cualquier material apropiado, por ejemplo, un sólido, un núcleo sólido, un metal, un dendrímero, una micela polimérica, un óxido metálico, o una

15 proteína o fragmento o combinaciones de los mismos. El término "sustancialmente esférico", como se usa en este documento, significa que la forma de las partículas no se desvía de una esfera en más de aproximadamente 10%.

[0111] Los términos "respuesta inflamatoria" e

20 "inflamación" tal como se usan en el presente documento indican la respuesta biológica compleja de los tejidos vasculares de un individuo a estímulos dañinos, tales como patógenos, células dañadas o irritantes, e incluye la secreción de citocinas y, más particularmente, de citocinas

proinflamatorias, es decir, citocinas que se producen predominantemente por células inmunes activadas y están involucradas en la amplificación de reacciones inflamatorias. Las citocinas proinflamatorias ejemplares incluyen, pero sin limitación, IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α IL-17, IL21, IL23, IL27 y TGF- β . Las inflamaciones ejemplares incluyen inflamación aguda e inflamación crónica. La inflamación aguda indica un proceso a corto plazo caracterizado por los signos clásicos de inflamación (hinchazón, enrojecimiento, dolor, calor y pérdida de función) debido a la infiltración de los tejidos por el plasma y los leucocitos. Una inflamación aguda generalmente ocurre mientras el estímulo nocivo está presente y cesa una vez que el estímulo ha sido eliminado, descompuesto o tapiado por cicatrices (fibrosis). La inflamación crónica indica una afección caracterizada por inflamación activa concurrente, destrucción de tejidos e intentos de reparación. La inflamación crónica no se caracteriza por los signos clásicos de inflamación aguda mencionados anteriormente. En cambio, el tejido inflamado crónicamente se caracteriza por la infiltración de células inmunes mononucleares (monocitos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas), destrucción de tejidos e intentos de curación, que incluyen angiogénesis y fibrosis. Una inflamación puede inhibirse en el sentido de la presente

descripción al afectar y en particular inhibir cualquiera de los eventos que forman la respuesta biológica compleja asociada con una inflamación en un individuo.

[0112] Como se usa en el presente documento, el término

5 antígeno "relevante para la enfermedad" se refiere a un antígeno o fragmento del mismo seleccionado para tratar una enfermedad seleccionada y está implicado en el proceso de la enfermedad. Por ejemplo, un antígeno relevante para la diabetes es un antígeno o fragmento del mismo que, cuando se

10 presenta, produce una respuesta inmune que sirve para tratar la diabetes; por lo tanto, se selecciona un antígeno relevante para la diabetes que produce tal efecto para tratar la diabetes. Se selecciona un antígeno relevante para la esclerosis múltiple (EM) para tratar la EM. No se

15 seleccionaría un antígeno relevante para la diabetes para tratar la EM. De manera similar, un antígeno relacionado con la autoinmunidad es un antígeno que es relevante para una enfermedad autoinmune y no se seleccionaría para el tratamiento de un trastorno o enfermedad que no sea la

20 autoinmunidad, por ejemplo, el cáncer. Los antígenos ejemplares no relevantes y relevantes para la enfermedad se describen en el presente documento y, además, dichos antígenos pueden determinarse para una enfermedad particular en base a técnicas, mecanismos y métodos documentados en la

literatura.

[0113] "Enfermedad o trastorno autoinmune" incluye enfermedades o trastornos que surgen y se dirigen contra los propios tejidos u órganos de un individuo o manifestación de los mismos o una afección resultante de los mismos. En una realización, se refiere a una afección que resulta de, o se ve agravada por, la producción de células T que son reactivas con tejidos y antígenos corporales normales. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, artritis (artritis reumatoide como artritis aguda, artritis reumatoide crónica, gota o artritis gotosa, artritis gotosa aguda, artritis inmunológica aguda, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, colágeno tipo II inducida por artritis, artritis infecciosa, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriásica, enfermedad de Still, artritis vertebral, artritis reumatoide de inicio juvenil, osteoartritis, artritis crónica progrediente, artritis deformante, poliartritis crónica, artritis reactiva y espondilitis anquilosante), inflamatoria enfermedades hiperproliferativas de la piel, psoriasis como psoriasis en placas, psoriasis guttata, psoriasis pustulosa y psoriasis de las uñas, atopia que incluye enfermedades atópicas como fiebre del heno y síndrome de Job, dermatitis que incluye dermatitis de contacto, dermatitis de contacto crónica,

dermatitis exfoliativa, dermatitis alérgica, dermatitis alérgica de contacto, dermatitis herpetiforme, dermatitis numular, dermatitis seborreica, dermatitis inespecífica, dermatitis de contacto irritante primaria y dermatitis

5 atópica, síndrome de hiperglucemia ligada al cromosoma X, enfermedades alérgicas inflamatorias intraoculares, urticaria como urticaria alérgica crónica e idiopática crónica urticaria, que incluye urticaria autoinmune crónica, miositis, polimiositis/dermatomiositis, dermatomiositis

10 juvenil, necrólisis epidérmica tóxica, esclerodermia (incluida esclerodermia sistémica), esclerosis como esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (EM) como EM espino-óptica, EM progresiva primaria (EMP)) y EM remitente recurrente (EMRR), esclerosis sistémica progresiva,

15 aterosclerosis, arteriosclerosis, esclerosis diseminada, esclerosis atáxica, trastorno del espectro de neuromielitis óptica (NMO, también conocido como enfermedad de Devic o síndrome de Devic), enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (por ejemplo, Enfermedad de Crohn, gastrointestina

20 autoinmune 1 enfermedades, colitis como colitis ulcerosa, colitis ulcerosa, colitis microscópica, colitis colágena, colitis poliposa, enterocolitis necrotizante, colitis transmural y enfermedad inflamatoria intestinal autoinmune), inflamación intestinal, pioderma gangrenoso, eritema nudoso,

colangitis esclerosante primaria, síndrome de dificultad respiratoria, incluido el síndrome de distrés respiratorio agudo o adulto (SDRA), meningitis, inflamación de toda o parte de la úvea, iritis, coroiditis, un trastorno

5 hematológico autoinmune, espondilitis reumatoide, sinovitis reumatoide, angioedema hereditario, daño del nervio craneal como en la meningitis, herpes gestacional, penfigoide gestacional, prurito escroto, insuficiencia ovárica prematura autoinmune, pérdida de audición repentina debido a una

10 enfermedad autoinmune, enfermedades mediadas por IgE como anafilaxia y rinitis alérgica y atópica, encefalitis como la encefalitis de Rasmussen y la encefalitis límbica o del tallo cerebral, uveítis, como uveítis anterior, uveítis anterior aguda, g uveítis ranulomatosa, uveítis no granulomatosa,

15 uveítis facoantigénica, uveítis posterior o uveítis autoinmune, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico, como glomerulonefritis crónica o aguda, como GN primaria, GN inmunomediada, GN membranosa (nefropatía membranosa) GN o nefropatía membranosa idiopática, GN

20 proliferativa membrano o membranosa (GNMP), incluidos el Tipo I y el Tipo II, y GN rápidamente progresiva, nefritis proliferativa, insuficiencia endocrina poliglandular autoinmune, balanitis que incluye balanitis circumscripta plasmacellularis, balanitis que incluye balanitis

circumscripta plasmacellularis, balanopostitis, eritema
 anular, centrífugo, eritema centrífugo, eritema centrífugo,
 eritema, centrífuga perstans, eritema multiforme, granuloma
 anular, liquen nitroso, liquen escleroso y atrófico, liquen
 5 simple crónico, liquen espinuloso, liquen plano, ictiosis
 lamelar, hiperqueratosis epidermolítica, queratosis
 premaligna, pioderma gangrenoso, condiciones alérgicas y
 reacciones alérgicas, reacciones alérgicas, reacciones
 alérgicas y reacciones alérgicas eccema ic o atópico, eccema
 10 asteatótico, eczema dishidrótico y eccema palmoplantar
 vesicular, asma como asma bronquial, asma bronquial y asma
 autoinmune, afecciones que implican infiltración de células T
 y respuestas inflamatorias crónicas, reacciones inmunes
 contra antígenos extraños como el feto Clústers sanguíneos
 15 ABO durante el embarazo, enfermedad inflamatoria pulmonar
 crónica, miocarditis autoinmune, deficiencia de adhesión
 leucocitaria, lupus, incluida la nefritis lúpica, lupus
 cerebritis, lupus pediátrico, lupus pediátrico, lupus no
 renal, lupus extrarrenal, lupus discoide y lupus eritematoso
 20 discoide, alopecia lupus, lupus eritematoso sistémico (LES)
 como LES cutáneo o LES cutáneo subagudo, síndrome de lupus
 neonatal (LEN) y lupus eritematoso diseminado, diabetes tipo
 I, diabetes tipo II, diabetes tipo II, diabetes autoinmune
 latente en adultos (o diabetes tipo 1.5). [0001] También se

contemplan respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, sarcoidosis, granulomatosis que incluye granulomatosis linfomatoide, granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, 5 vasculitis, qué vasculitis, vasculitis de vasos grandes (pequeña la polimialgia y la rítmica gigante). células (arterias de Takayasu)), vasculitis de vasos medianos (incluida la enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa/periarteritis nodosa), poliarteritis microscópica, 10 inmunovasculitis, vasculitis del SNC, vasculitis cutánea, vasculitis de hipersensibilidad, vasculitis necrotizante como vasculitis por vasculitis por vasculitis y vasculitis asociada a la vasculitis por necrosis sistémica, como la vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS) y la vasculitis 15 de pequeños vasos asociados a ANCA, la arteritis temporal, la anemia aplásica, la anemia aplásica autoinmune, la anemia positiva de Coombs, la anemia de Diamond Blackfan, la anemia hemolítica o la anemia hemolítica inmune, incluida la anemia hemolítica autoinmune (AIHA), Enfermedad de Addison, 20 neutropenia autoinmune, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que involucran diapedesis de leucocitos, trastornos inflamatorios del SNC, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, síndrome de lesiones de múltiples ples órganos como las secundarias a septicemia, trauma o

hemorragia, enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal glomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, síndrome antifosfolípidos, neuritis alérgica, enfermedad/síndrome de

5 Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide, como penfigoide ampollosa y penfigoide cutáneo, pénfigo (incluido el pénfigo vulgar, el pénfigo foliáceo, el pénfigo de la membrana mucosa y el

10 pénfigo eritematoso), poliendocrino autoinmunes, enfermedad o síndrome de Reiter, lesión térmica, preeclampsia, un trastorno del complejo inmunitario, como la nefritis del complejo inmunitario, la nefritis mediada por anticuerpos, la polineuropatía nefritis, necro uropatía como las

15 polineuropatías IgM o la neuropatía mediada por IgM, la trombocitopenia autoinmune o inmunomediada como la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), incluida la PTI crónica o aguda, la púrpura trombocitopénica adquirida, la escleritis como la ceratoescleritis idiopática, la prueba de la

20 episcleritis autoinmunitaria, episcleritis y ovario, orquitis y ooforitis autoinmunes, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, enfermedades endocrinas autoinmunes, incluida tiroiditis, como tiroiditis autoinmune, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), o

tiroiditis subaguda, enfermedad tiroidea autoinmune,
 hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Grave, enfermedad de
 Grave como síndromes poliglandulares autoinmunes (o síndromes
 de endocrino), síndromes paraneoplásicos, incluidos síndromes
5 paraneoplásicos neurológicos como el síndrome miasténico de
 Lambert-Eaton o el síndrome de Lambert-Eaton, síndrome de
 hombre rígido o rígido, encefalomiелitis como alergia
 encefalomiелitis ic o encefalomiелitis alérgica y en
 cefalomiелitis alérgica experimental (EAE), miastenia gravis
10 como miastenia gravis asociada a timoma, degeneración
 cerebelosa, neuromiotonía, síndrome de opsoclono u opsoclono
 mioclono (OMS) y neuropatía sensorial, síndrome de neuropatía
 motora multifocal, neuropatía autoinmune, síndrome de la
 neuropatía motora multifocal, hepatitis crónica, hepatitis
15 lupoide, hepatitis de células T gigantes, hepatitis activa
 crónica o hepatitis activa crónica autoinmune, neumonitis
 linfoide intersticial (LIP), bronquiолitis obliterante (sin
 trasplante) vs NSIP, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad
 de Berger (nefropatía por IgA), Nefropatía idiopática por
20 IgA, dermatosis lineal por IgA, dermatosis neutrofílica
 febril aguda, dermatosis pustular subcorneal, dermatosis
 acantolítica transitoria, cirrosis, como cirrosis biliar
 primaria y neumonocirrosis, síndrome de enteropatía
 autoinmune, enfermedad celíaca, enfermedad celíaca

(enteropatía por gluten), enfermedad refractaria, enfermedad idiopática, crioglobulinemia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA; enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad del oído autoinmune como la enfermedad

5 autoinmune del oído interno (AIED), pérdida de audición autoinmune, policondritis como policondritis refractaria o recidivante o recidivante, proteinosis alveolar pulmonar, síndrome de Cogan/queratitis intersticial no sifilítica, parálisis de Bell, enfermedad/síndrome de Sweet, rosácea

10 autoinmune, dolor asociado al zoster, amiloidosis, una linfocitosis no cancerosa, una linfocitosis primaria B, que incluye monoclitosis primaria linfocitosis celular (por ejemplo, gammapatía monoclonal benigna y gammapatía monoclonal de importancia indeterminada, MGUS), neuropatía

15 periférica, síndrome paraneoplásico, canalopatías como epilepsia, migraña, arritmia, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica y canalopatías del SNC, miopatía inflamatoria, focal o segmentaria o segmentaria focal l glomeruloesclerosis (FSGS), oftalmopatía endocrina,

20 uveoretinitis, coriorretinitis, trastorno hepatológico autoinmune, fibromialgia, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes tales como enfermedades desmielinizantes autoinmunes y desmielinización

crónica, síndrome de Dress, desmielinización crónica, síndrome de Dress, desmielinizante crónico alopecia areata, alopecia total, síndrome CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmune masculina y femenina, por ejemplo, debido a anticuerpos anti espermatozoides, enfermedad mixta del tejido conectivo, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, pulmón de granjero, eritema multiforme, síndrome post-cardiotomía, síndrome de Cushing, pulmón de aves de corral, angiitis granulomatosa alérgica, angiitis linfocítica benigna, síndrome de Alport, alveolitis como alveolitis alérgica y alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, reacción a la transfusión en, lepra, malaria, enfermedades parasitarias como leishmaniasis, kaposiomas, esquistosomiasis, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, síndrome de Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, endoftalmitis, eritema elevado y urticario, eritroblastosis fetal, facitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis como ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, iridociclitis

5

10

15

20

endoftalmia, endoftalmia, endoftalmia, endoftalmia,
 endoftalmia, endoftalmia, parálisis facial idiopática,
 síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, enfermedad de
 Hamman-Rich, hipoacusia sensorial, hemoglobinuria
5 paroxística, hipogonadismo, ileitis regional, leucopenia,
 mononucleosis infecciosa, mielitis transversa, idiopática
 primaria mixedema, nefrosis, oftalmia simpática, orquitis
 granulomatosa, pancreatitis, polirradiculitis aguda, pioderma
 gangrenoso, tiroiditis de Quervain, atrofia espénica
10 adquirida, timoma no maligno, vitiligo, síndrome de shock
 tóxico, intoxicación alimentaria, afecciones que implican
 infiltración de células T, leucocitos deficiencia, respuestas
 inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y
 retardada mediada por citocinas y linfocitos T, enfermedades
15 que implican diapedesis leucocitaria, síndrome de lesión de
 múltiples órganos, enfermedades mediadas por el complejo
 antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal
 antiglomerular, neuritis alérgica, poliendocrinopatías
 autoinmunes, ooforitis primaria mixedema, gastritis atrófica
20 autoinmune, oftalmia simpática, enfermedades reumáticas,
 enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome nefrótico,
 insulinitis, falla poliendocrina, síndrome poliglandular
 autoinmune tipo I, hipoparatiroidismo idiopático de inicio en
 el adulto (AOIH), cardiomiopatía como cardiomiopatía

dilatada, epidermis dilatada adquirida (EBA), hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrótico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis purulenta o no purulenta, sinusitis aguda o crónica, sinusitis etmoidal, frontal, maxilar o esfenoidal,

5 un trastorno relacionado con eosinófilos como eosinofilia, infiltración pulmonar eosinofilia, síndrome de eosinofilia-mialgia, síndrome de Loffin, síndrome de Loffin, síndrome de Loffin, síndrome de Loffin, neumonía, eosinofilia pulmonar tropical, aspergilosis bronconeumónica, aspergiloma

10 o granulomas que contienen eosinófilos, anafilaxia, espondiloartritis seronegativas, enfermedad autoinmune poliendocrina, colangitis esclerosante, esclera, epiesclera, candidiasis mucocutánea crónica, síndrome de Autofagia, hipoacusia, hipoacusia, brutón, diabetes miocárdica. síndrome

15 de telangiectasia, angiectasia, trastornos autoinmunes asociados con la enfermedad del colágeno, reumatismo, enfermedad neurológica, linfadenitis, reducción de la respuesta de la presión arterial, disfunción vascular, lesión tisular, isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia

20 renal, isquemia cerebral y enfermedad que acompaña a la vascularización, trastornos de hipersensibilidad alérgica, glomerulonefritis, lesión por reperfusión, trastorno de reperfusión isquémica, lesión por reperfusión de miocardio u otros tejidos, traqueobronquitis linfomatosa, dermatosis

inflamatorias, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, insuficiencia orgánica múltiple, enfermedades ampollas, renal necrosis cortical, meningitis purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso

5 central, trastornos inflamatorios oculares y orbitarios, síndromes asociados a la transfusión de granulocitos, toxicidad inducida por citocinas, narcolepsia, inflamación grave aguda, inflamación crónica intratable, pielitis, hiperplasia endoarterial, úlcera péptica, valvulitis,

10 enfisema, alopecia areata, inflamación del tejido adiposo/diabetes tipo II, inflamación del tejido adiposo asociada a la obesidad/resistencia a la insulina y endometriosis.

[0114] En algunas realizaciones, el trastorno o

15 enfermedad autoinmune puede incluir, pero no se limita a, diabetes mellitus tipo I y tipo II, prediabetes, rechazo de trasplante, esclerosis múltiple, un trastorno relacionado con esclerosis múltiple, insuficiencia ovárica prematura, esclerodermia, síndrome/enfermedad de Sjögren, lupus,

20 vitiligo, alopecia (calvicie), insuficiencia poliglandular, enfermedad de Graves, hipotiroidismo, polimiositis, pénfigo, enfermedad de Crohn, colitis, hepatitis autoinmune, hipopituitarismo, miocarditis, enfermedad de Addison, enfermedades autoinmunes de la piel, uveítis, uveítis anemia,

hipoparatiroidismo o artritis reumatoide. Otras indicaciones de interés incluyen, entre otras, asma, asma alérgica, cirrosis biliar primaria, cirrosis, trastorno del espectro óptico de neuromielitis (enfermedad de Devic, esclerosis múltiple opticoespinal (OSMS)), pénfigo vulgar, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), artritis, Artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad celíaca, psoriasis, cardiomiopatía autoinmune, miocardiopatía dilatada idiopática (IDCM), miastenia Graves, uveítis, espondilitis anquilosante, miopatías mediadas por el sistema inmune, cáncer de próstata, síndrome de la próstata, síndrome antifosfolípido (ANCA+), aterosclerosis, dermatomiositis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema, lesión de la médula espinal, lesión traumática, destrucción pulmonar inducida por el tabaco, vasculitis asociada a ANCA, psoriasis, colangitis esclerosante, colangitis esclerosante primaria y enfermedades del sistema nervioso central y periférico.

[0115] En algunas realizaciones, el trastorno o enfermedad autoinmune puede incluir, pero no se limita a, diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad celíaca, cirrosis biliar primaria, pénfigo, pénfigo foliáceo, pénfigo vulgar, trastorno del espectro de neuromielitis óptica, artritis (que incluye reumatoide artritis), asma alérgica, enfermedad

inflamatoria intestinal (incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), lupus eritematoso sistémico, aterosclerosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema, psoriasis, hepatitis autoinmune, uveítis, síndrome de Sjögren, escleroderma, síndrome antifosfolípido, ANCA-vasculitis asociada y síndrome de la persona rígida.

[0116] La esclerosis múltiple (EM) también se conoce como "esclerosis diseminada", "encefalomielitis diseminada" o "encefalomielitis alérgica". La EM es una enfermedad inflamatoria en la que se dañan las vainas de mielina grasa alrededor de los axones del cerebro y la médula espinal, lo que lleva a la desmielinización y cicatrización, así como a un amplio espectro de signos y síntomas. Los trastornos relacionados con la esclerosis múltiple incluyen, por ejemplo, el trastorno del espectro óptico de neuromielitis (NMO), la uveítis, el dolor neuropático y similares.

[0117] La "glucoproteína oligodendrocítica de mielina" (MOG) es una glucoproteína que se cree que es importante en el proceso de mielinización de los nervios en el sistema nervioso central (SNC). En humanos, esta proteína está codificada por el gen MOG. Se especula que sirve como una "molécula de adhesión" necesaria para proporcionar integridad estructural a la vaina de mielina y se sabe que se desarrolla tarde en el oligodendrocito. Los números de acceso de GenBank

NM_001008228.2 y NP_001008229.1 representan la secuencia de ARNm y proteína, respectivamente, del gen MOG. La secuencia asociada con cada uno de estos números de acceso de GenBank se incorpora como referencia para todos los fines.

5 [0118] Como se usa en este documento, los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que típicamente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma

10 y leucemia y metástasis de los mismos. El término "metástasis" se refiere a la transferencia de organismos productores de enfermedades o de células malignas o cancerosas a otras partes del cuerpo a través de la sangre o vasos linfáticos o superficies membranosas. Ejemplos no

15 limitantes de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón escamoso, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas,

20 glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer

de tiroides, hígado carcinoma y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello. La tabla 2 es una lista ejemplar no limitante de antígenos relevantes para el cáncer para su uso en esta descripción.

- 5 [0119] Como se usa en este documento, el término "coestimulador" pretende moléculas que producen una señal secundaria in vivo que sirve para activar células T vírgenes en células T específicas de antígeno capaces de producir una respuesta inmune a las células que poseen dicho antígeno
- 10 específico. La presente descripción no se limita a ninguna molécula coestimuladora específica. Las diversas moléculas coestimuladoras son bien conocidas en la técnica. Algunos ejemplos no limitantes de moléculas coestimuladoras son 4-IBBL, OX40L, CD40, IL-15/IL-15Ra, CD28, CD80, CD86, CD30L e
- 15 ICOSL como son sus respectivos receptores y polinucleótidos que los codifican. En realizaciones específicas, las moléculas coestimuladoras de la presente divulgación pueden ser uno cualquiera o más de los siguientes ligandos y sus respectivos receptores: B7-1/CD80, BTLA, B7-2/CD86, CD28, B7-
- 20 H1/PD-L1, CTLA-4, B7-H2, Gi24/VISTA/B7-H5, B7-H3, ICOS, B7-H4, PD-1, B7-H6, PD-L2/B7-DC, B7-H7, PDCD6, LILRA3/CD85e, LILRB2/CD85d/ILT4, LILRA4/CD85g/ILT7, LILRB3/CD85a/ILT5, LILRB1/CD85j/ILT2, LILRB4/CD85k/ILT3, 4-1BB/TNFRSF9/CD137, TNBF18, TNB4 Ligando/TNFSF9, HVEM/TNFRSF14,

BAFF/BLyS/TNFSF13B, LIGHT/TNFSF14, BAFF R/TNFRSF13C, Limfotoxina-alfa/TNF-beta, CD27/TNFRSF7, OX40/TNFRSF4, CD27 Ligando/TNFSF7, TNX4, OX40 Ligando/TNFRSF8, RELT/TNFRSF19L, CD30 Ligando/TNFSF8, TACI/TNFRSF13B, CD40/TNFRSF5, 5 TL1A/TNFSF15, CD40 Ligando/TNFSF5, TNF-alfa, DR3/TNFRSF25, TNF RII/TNFRSF1B, GITR/2F/4 SLAMF4, CD84/SLAMF5, BLAME/SLAMF8, CD229/SLAMF3, CD2, CRACC/SLAMF7, CD2F-10/SLAMF9, NTB-A/SLAMF6, CD48/SLAMF2, SLAM/CD150, CD58/LFA-3, CD7, DPPIV/CD26, CD96, EphB6, CD160, Integrina alfa 4 beta 1, 10 CD200, Integrina alfa 4 beta 7/LPAM-1, CD300a/LMIR1, LAG-3, CRTAM, TIM-1/KIM-1/HAVCR, DAP12, TIM-4, Dectin-1/CLEC7A, TSLP R, ICOSL o equivalentes biológicos de cada uno de los mismos.

[0120] Como se usa en el presente documento, el término "ligando coestimulador" pretende moléculas de la superficie 15 celular que interactúan con moléculas coestimuladoras.

[0121] Como se usa en el presente documento, el término "citocina" pretende proteínas de bajo peso molecular secretadas por diversas células en el sistema inmunitario que actúan como moléculas de señalización para regular una amplia 20 gama de procesos biológicos dentro del cuerpo a nivel molecular y celular. Las "citocinas" incluyen proteínas inmunomoduladoras individuales que se incluyen en la clase de linfocinas, interleucinas o quimiocinas.

[0122] Como se usa en el presente documento, el término "diabetes" se refiere a un trastorno variable del metabolismo de carbohidratos causado por una combinación de factores hereditarios y ambientales y generalmente se caracteriza por una secreción o utilización inadecuada de insulina, por una producción excesiva de orina, por cantidades excesivas de azúcar en la sangre y la orina, y por sed, hambre y pérdida de peso. La diabetes se caracteriza por la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2. El ratón diabético no obeso ("NOD") es un modelo animal aceptado para el estudio y el tratamiento de la diabetes. La diabetes tipo 1 (T1D) en ratones está asociada con células T CD8+ autorreactivas. Los ratones diabéticos no obesos (NOD) desarrollan una forma de T1D, muy parecida a la T1D humana que resulta de la destrucción selectiva de las células β pancreáticas por las células T que reconocen una lista creciente de autoantígenos. Aunque el inicio de T1D claramente requiere la contribución de las células CD4+, existe evidencia convincente de que T1D depende de las células T CD8+. Se ha descubierto que una fracción significativa de células CD8+ asociadas a islotes en ratones NOD usan TCR V α 17-J α 42 + invariables de CDR3, denominados "tipo 8.3-TCR". Estas células, que reconocen el mimotopo NRP-A7 (definido usando las bibliotecas de péptidos combinatorios) en el contexto de la molécula de MHC Kd, ya

son un componente significativo de los primeros infiltrados de CD8+ del islote NOD, son diabetogénicos y se dirigen a un péptido de la proteína relacionada con la subunidad catalítica de glucosa-6-fosfatasa específica de islotes (IGRP), una proteína de función desconocida. Las células CD8+ que reconocen este péptido (IGRP206-214, similar a NRP-A7) son inusualmente frecuentes en la circulación ($>1/200$ células CD8+). En particular, la progresión de la insulitis a la diabetes en ratones NOD está invariablemente acompañada por la expansión cíclica del clúster circulante de CD8+ reactivo con IGRP206-214 y por la maduración ávida de su contraparte asociada a los islotes. Más recientemente, se ha demostrado que las células CD8+ asociadas a los islotes en ratones NOD reconocen múltiples epítomos de IGRP, lo que indica que IGRP es un autoantígeno dominante para las células CD8+, al menos en la T1D murina. Las células CD8+ asociadas a los islotes NOD, particularmente las que se encuentran al principio del proceso de la enfermedad también reconocen un epítomo de insulina (Ins B15-23).

[0123] Como se usa en el presente documento, el término "pre-diabetes" pretende un período asintomático que precede a una afección diabética caracterizada por daño subclínico de células beta en el que el paciente exhibe niveles normales de glucosa en plasma. También se caracteriza por la presencia de

autoanticuerpos de células de los islotes (ICA) y, cuando está cerca del inicio de los síntomas clínicos, puede estar acompañado de intolerancia a la glucosa.

- [0124] Como se usa en el presente documento, el término
- 5** "trastorno relacionado con la esclerosis múltiple" se refiere a un trastorno que se presenta conjuntamente con una susceptibilidad a la EM o con la EM. Los ejemplos no limitativos de este tipo incluyen neuromielitis, trastorno del espectro óptico (NMO), uveítis, esclerosis neuropática
- 10** del dolor, aterosclerosis, arteriosclerosis, esclerosis diseminada, esclerosis sistémica, esclerosis sistémica, esclerosis óptica primaria, esclerosis múltiple progresiva primaria (EMPP) y esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR), esclerosis sistémica progresiva y esclerosis atáxica.
- 15** [0125] Los términos "epítipo" y "determinante antigénico" se usan indistintamente para referirse a un sitio en un antígeno al que las células B o T responden o reconocen. Los epítipos de células B se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no
- 20** contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente en

el tratamiento con disolventes desnaturalizantes. Un epítopo típicamente incluye al menos 3, y más usualmente al menos 5 u 8-20, aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítomos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Glenn E. Morris, Epitope Mapping Protocols (1996). Las células T reconocen epítomos continuos de aproximadamente nueve aminoácidos para las células CD8 o aproximadamente 9-20 aminoácidos para las células CD4. Las células T que reconocen el epítopo pueden identificarse mediante ensayos in vitro que miden la proliferación dependiente de antígeno, según lo determinado por la incorporación de 3H-timidina por las células T cebadas en respuesta a un epítopo (Burke et al., J. Inf. Dis., 170:1110-1119, 1994), por destrucción dependiente de antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos, Tigges et al., J. Immunol., 156 (10): 3901-3910, 1996) o por secreción de citoquinas. La presencia de una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse mediante ensayos de proliferación (células T CD4+) o ensayos CTL (linfocitos T citotóxicos).

[0126] Opcionalmente, un antígeno o preferiblemente un epítopo de un antígeno, puede conjugarse químicamente o expresarse como una proteína de fusión con otras proteínas,

tales como proteínas relacionadas con MHC y MHC.

[0127] Como se usa en el presente documento, los términos "individual", "paciente" y "sujeto" se usan como sinónimos y se refieren a un mamífero. En algunas realizaciones, el individuo es un humano. En otras realizaciones, el individuo es un mamífero que necesita medicina veterinaria o es un mamífero comúnmente usado en un laboratorio. En algunas realizaciones, el mamífero es un ratón, rata, simio, canino, felino, bovino, equino u ovino.

10 [0128] Como se usa en esta descripción, el término "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es recombinante o se ha aislado sin ácido nucleico genómico total. Dentro del término "polinucleótido" se incluyen oligonucleótidos (ácidos nucleicos que tienen 100
15 residuos o menos de longitud), vectores recombinantes, que incluyen, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus y similares. Los polinucleótidos incluyen, en ciertos aspectos, secuencias reguladoras, aisladas sustancialmente lejos de sus genes naturales o secuencias codificantes de proteínas. Los
20 polinucleótidos pueden ser ARN, ADN, análogos de los mismos o una combinación de los mismos. Un ácido nucleico que codifica todo o parte de un polipéptido puede contener una secuencia contigua de ácido nucleico que codifica todo o una porción de dicho polipéptido de las siguientes longitudes:10, 20, 30,

40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160,
 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280,
 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400,
 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510,
5 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590 600, 610, 620, 630,
 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750,
 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870,
 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990,
 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090,
10 1095, 1100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000,
 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 9000, 10000 o más
 nucleótidos, nucleósidos o pares de bases. También se
 contempla que un polipéptido particular de una especie dada
 puede estar codificado por ácidos nucleicos que contienen
15 variaciones naturales que tienen secuencias de ácido nucleico
 ligeramente diferentes, pero, sin embargo, codifican la misma
 proteína, polipéptido o péptido sustancialmente similar.

[0129] Un polinucleótido está compuesto por una
 secuencia específica de cinco bases de nucleótidos: adenina
20 (A); citosina (C); guanina (G); timina (T); y uracilo (U)
 para timina cuando el polinucleótido es ARN. Por lo tanto, el
 término "secuencia polinucleotídica" es la representación
 alfabética de una molécula polinucleotídica. Esta
 representación alfabética puede ingresarse en bases de datos

en una computadora que tiene una unidad central de procesamiento y usarse para aplicaciones bioinformáticas como la genómica funcional y la búsqueda de homología.

[0130] Los términos "aislado" o "recombinante" tal como
5 se usan en el presente documento con respecto a ácidos nucleicos, tales como ADN o ARN, se refieren a moléculas separadas de otros ADN o ARN, respectivamente, que también están presentes en la fuente natural de la macromolécula como polipéptidos. El término "ácido nucleico aislado o
10 recombinante" pretende incluir fragmentos de ácido nucleico que no se producen naturalmente como fragmentos y no se encontrarían en el estado natural. El término "aislado" también se usa en el presente documento para referirse a polinucleótidos, polipéptidos y proteínas que están aislados
15 de otras proteínas celulares y está destinado a abarcar tanto polipéptidos purificados como recombinantes. En otras realizaciones, el término "aislado o recombinante" significa separado de constituyentes, celulares y de otro tipo, en los que la célula, tejido, polinucleótido, péptido, polipéptido,
20 proteína, anticuerpo o fragmento (s) de los mismos, están normalmente asociados en la naturaleza. Por ejemplo, una célula aislada es una célula que está separada del tejido o células de fenotipo o genotipo diferente. Un polinucleótido aislado se separa de los nucleótidos contiguos 3' y 5' con

los que normalmente está asociado en su entorno nativo o natural, por ejemplo, en el cromosoma. Como es evidente para los expertos en la materia, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento (s) no natural
5 no requiere "aislamiento" para distinguirlo de su contraparte natural.

[0131] "Exógeno" con respecto a un ácido nucleico o polinucleótido indica que el ácido nucleico es parte de una construcción de ácido nucleico recombinante, o no está en su
10 entorno natural. Por ejemplo, un ácido nucleico exógeno puede ser una secuencia de una especie introducida en otra especie, es decir, un ácido nucleico heterólogo. Típicamente, dicho ácido nucleico exógeno se introduce en las otras especies a través de una construcción de ácido nucleico recombinante. Un
15 ácido nucleico exógeno también puede ser una secuencia que es nativa de un organismo y que se ha reintroducido en las células de ese organismo. Un ácido nucleico exógeno que incluye una secuencia nativa a menudo se puede distinguir de la secuencia natural por la presencia de secuencias no
20 naturales unidas al ácido nucleico exógeno, por ejemplo, secuencias reguladoras no nativas (promotores, potenciadores, terminadores transcripcionales, IRES, secuencias de salto de ribosomas) que flanquean una secuencia nativa en una construcción de ácido nucleico recombinante, o la falta de

secuencias de intrones. Además, los ácidos nucleicos exógenos transformados establemente se integran típicamente en posiciones distintas de la posición en la que se encuentra naturalmente la secuencia nativa. Los elementos exógenos
5 pueden agregarse a una construcción, por ejemplo, usando recombinación genética.

[0132] Como se usa en el presente documento, los términos "homólogo", "homología" u "porcentaje de homología" cuando se usan en el presente documento para describir una
10 secuencia de ácido nucleico, en relación con una secuencia de referencia, pueden determinarse usando la fórmula descrita por Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, 1990, modificado como en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877, 1993). Dicha fórmula se incorpora a los programas
15 básicos de herramientas de búsqueda de alineación local (BLAST) de Altschul et al. (J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990). El porcentaje de homología de secuencias se puede determinar utilizando la versión más reciente de BLAST, a partir de la fecha de presentación de esta solicitud.

20 [0133] El porcentaje de identidad de secuencia (%) con respecto a una secuencia de polipéptidos de referencia es el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, después de

alinear las secuencias e introducir huecos, si necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de

5 determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias maneras que se conocen, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los parámetros apropiados para alinear secuencias se pueden

10 determinar, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la máxima alineación en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los fines de este documento, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de

15 comparación de secuencias ALIGN-2. El programa de computadora de comparación de secuencia ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente se ha archivado con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos, Washington D.C., 20559, donde está registrado bajo el

20 Registro de Derechos de Autor de los Estados Unidos No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente en Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX,

incluido UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencia son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

[0134] En situaciones donde ALIGN-2 se emplea para las

5 comparaciones de secuencias de aminoácidos, el% de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un cierto El% de

10 identidad de secuencia de aminoácidos con, con o contra una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula de la siguiente manera:100 veces la fracción X/Y , donde X es el número de residuos de aminoácidos calificados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2

15 en la alineación de ese programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el% de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual

20 al% de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A. A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de% de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en este documento se obtienen como se describe en el párrafo anterior usando el programa informático ALIGN-2.

[0135] Se pretende que una "composición" signifique una combinación de agente activo y otro compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente o marcador detectable) o activo, tal como un adyuvante. En ciertas realizaciones, la
5 composición no contiene un adyuvante.

[0136] Una "composición farmacéutica" está destinada a incluir la combinación de un agente activo con un vehículo, inerte o activo, haciendo que la composición sea adecuada para uso diagnóstico o terapéutico in vitro, in vivo o ex
10 vivo.

[0137] Como se usa en el presente documento, una "proteína" o "polipéptido" o "péptido" se refiere a una molécula que comprende al menos cinco residuos de aminoácidos.

15 [0138] Otros objetos, características y ventajas de la presente descripción serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. También se proporcionan definiciones adicionales en el mismo. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien
20 indican realizaciones específicas de la divulgación, se dan solo a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la divulgación serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

[0139] Esta divulgación proporciona un ensayo novedoso y las composiciones necesarias para realizar el ensayo. Una de tales composiciones es una célula aislada que comprende un receptor de células T recombinante (TCR) introducido de manera exógena, un marcador dependiente de la vía TCR y un correceptor que se une a un complejo del complejo de histocompatibilidad (MHC) principal de clase I o clase II. En otro aspecto, la célula aislada comprende un complejo de señalización de cadena CD3 de múltiples subunidades asociado a TCR, introducido exógenamente. En otro aspecto adicional, la célula aislada comprende un receptor introducido de forma exógena para una molécula coestimuladora o un receptor de citocina.

Células

[0140] La célula que se utilizará en un ensayo de potencia descrito aquí es una célula eucariota. La célula expresa mínimamente: 1) un TCR, recombinante o natural, que se une específicamente a un péptido-MHC que está acoplado al pMHC-NP a analizar; 2) un complejo de señalización de CD3 3) un marcador dependiente de la vía TCR; y 4) un correceptor de MHC. Algunas células o líneas celulares pueden expresar naturalmente un complejo de señalización de CD3 y un correceptor de MHC (por ejemplo, CD4 o CD8) a niveles suficientes para llevar a cabo el ensayo descrito en este

documento. Sin embargo, en base a la célula o línea celular específica, se puede introducir un correceptor MHC o uno o más polipéptidos del complejo de señalización de CD3 mediante un polinucleótido exógeno para aumentar la señal o regular la

5 señal de manera homogénea. La célula puede ser una célula primaria o una línea celular que ha sido diseñada para expresar uno o más de un receptor de células T recombinante (TCR), un marcador dependiente de la vía TCR, un correceptor MHC o uno o más polipéptidos de El complejo de señalización

10 de CD3. Ejemplos no limitativos de líneas celulares adecuadas que pueden diseñarse incluyen JurMA, Jurkat, BW5147, HuT-78, CEM, Molt-4, o la combinación de los mismos. Si la célula no expresa endógenamente ninguno de los receptores de células T recombinantes (TCR), un marcador dependiente de la vía TCR,

15 un correceptor MHC o uno o más polipéptidos del complejo de señalización de CD3, entonces ese componente puede expresarse a partir de un polinucleótido introducido en la célula o línea celular. En ciertas realizaciones, la célula no expresa endógenamente un complejo de señalización de CD3. En ciertas

20 realizaciones, la célula no expresa endógenamente un correceptor de MHC. En un aspecto, la célula expresa endógenamente un receptor para una molécula coestimuladora o una citocina. En ciertas realizaciones, la célula se expresa a bajo nivel o no expresa un receptor para una molécula

coestimuladora o una citocina, pero la expresión se regula cuando las células T se activan. La célula puede comprender una adición de uno o más de un polinucleótido exógeno que codifica un correceptor de MHC, un polipéptido que es parte

5 de un complejo de señalización de CD3. En ciertas realizaciones, el polipéptido que forma parte de un complejo de señalización de CD3 comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO: 553. En ciertas realizaciones, el polipéptido que

10 forma parte de un complejo de señalización de CD3 está codificado por el polinucleótido al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% homólogo a la SEQ ID NO: 554. En ciertas realizaciones, el correceptor de MHC comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100%

15 idéntica a la SEQ ID NO: 549 o 551. En ciertas realizaciones, el MHC co-receptor está codificado por el polinucleótido al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% homólogo a la SEQ ID NO: 550 o 552.

Receptor de Células T (TCR)

20 [0141] Las células o líneas celulares utilizadas para el ensayo de potencia descrito en este documento expresan un receptor de células T recombinante (TCR). Un receptor de células T recombinante es uno que está codificado por un polinucleótido que carece de uno o más de un 3'UTR, un 5'UTR,

una secuencia intrónica, o elementos promotores o potenciadores nativos. Este TCR recombinante puede ser codificado por un polinucleótido exógeno introducido por transducción, transfección o infección. En ciertas

5 realizaciones, el polinucleótido exógeno se integra en el genoma de la célula o línea celular. Los ejemplos no limitantes de receptores de células T incluyen, sin limitación, un heterodímero que comprende un TCR α y TCR β , un heterodímero que comprende TCR γ y TCR δ , y una

10 construcción de TCR de cadena única. En una determinada realización, el TCR se muriniza (es decir, en el que el TCR se optimiza para interactuar con una molécula CD4 murina). Se pueden encontrar ejemplos no limitantes de TCR α en GenBank, por ejemplo, los números de acceso de GenBank AAB31880.1,

15 AAB28318.1, AAB24428.1 y ADW95878.1, y equivalentes de cada uno de ellos. Los polinucleótidos que codifican estas proteínas se introducen en la célula utilizando métodos conocidos en la técnica y que pueden comprender además señales reguladoras acopladas operativamente para la

20 expresión en la superficie celular, potenciadores, así como vectores para la transducción y expresión.

[0142] Los ejemplos no limitantes de TCR β también se pueden encontrar en los números de acceso de GenBank AAB31887.1, AKG65861.1, ADW95908.1 y AAM53411.1, y

equivalentes de cada uno de ellos. Los polinucleótidos que codifican estas proteínas se transducen a la célula utilizando métodos conocidos en la técnica. Los polinucleótidos pueden ser señales reguladoras acopladas operativamente para la expresión en la superficie celular, potenciadores y también vectores para la transducción y expresión. En una realización, la cadena γ de TCR comprende una o más secuencias encontradas en GenBank, por ejemplo, los números de acceso de GenBank AAM21533.1, DAA30449.1 y

5 ABG91733.1 y equivalentes de cada uno de ellos. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos pueden transducirse a la célula. Los polinucleótidos pueden ser señales reguladoras acopladas operativamente para la expresión en la superficie celular, potenciadores y también

10 vectores para la transducción y expresión. En una realización, la cadena δ de TCR comprende una o más secuencias encontradas en GenBank, por ejemplo, los números de acceso de GenBank Q7YRN2.1, AAC48547.1, JC4663 y NP_001009418.1, y equivalentes de cada uno de ellos. Los

15 polinucleótidos que codifican estos polipéptidos pueden transducirse a la célula. Los polinucleótidos pueden ser señales reguladoras acopladas operativamente para la expresión en la superficie celular, potenciadores y también

20 vectores para la transducción y expresión. Las TCR de cadena

sencilla son conocidos en la técnica. Ejemplos no limitativos de TCR de cadena sencilla se describen en los documentos WO1996018105 y US20120252742, y equivalentes de cada uno de ellos, cada uno de los cuales se incorpora como referencia en su totalidad. Los polinucleótidos que codifican estas proteínas se transducen a la célula usando métodos conocidos en la técnica y que además comprenden señales reguladoras operativamente acopladas para la expresión en la superficie celular, potenciadores, así como vectores para la transducción y expresión.

[0143] En un aspecto, el TCR es un TCR de cadena sencilla como se describe en los documentos WO 1996018105 y US 2012/02522742. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos pueden transducirse a la célula. Los polinucleótidos pueden ser señales reguladoras acopladas operativamente para la expresión en la superficie celular, potenciadores y también vectores para la transducción y expresión.

[0144] En ciertas realizaciones, las TCR recombinantes para usar con los métodos y líneas celulares descritos en el presente documento comprenden una cadena de TCR alfa y una cadena de TCR beta. En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa y la cadena de TCR beta se traducen por separado. En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa y la cadena de

TCR beta se traducen como un polipéptido único. En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa y la cadena de TCR beta se traducen como un polipéptido único como un TCR de cadena única. En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa y la

5 cadena de TCR beta se traducen como un polipéptido único que comprende un sitio de escisión entre la cadena de TCR alfa y la cadena de TCR beta. En ciertas realizaciones, el sitio de escisión comprende una secuencia de salto de ribosomas. En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa y la cadena de

10 TCR beta se expresan en la superficie de la célula en una forma madura (secuencia líder secretora escindida).

[0145] En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa es al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 528, 530, 534, 536 539, 541, 544

15 o 546 y la cadena beta TCR es al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 529, 531, 535, 537, 540, 542, 545 o 547. En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa es al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a cualquiera de SEQ ID NO: 528, 530, 534,

20 536 539 o 541 y la cadena de TCR beta es al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 529, 531, 535, 537, 540 o 542.

[0146] En ciertas realizaciones, el TCR es específico para los aminoácidos 13 a 25 de la proteína relacionada con

la subunidad catalítica de glucosa-6-fosfatasa específica de los islotes humanos (QHLQKDYRAYYTF) unidos a DRB1*0301/DRA*0101. En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa es al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 528 o 530, la cadena de TCR beta está en al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticos a cualquiera de las SEQ ID NO: 529 o 531. En ciertas realizaciones, la cadena alfa TCR es al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntico a cualquiera de las SEQ ID NO: 534 o 536, la cadena de TCR beta es al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntico a cualquiera de los SEQ ID NO: 535 o 537.

[0147] En ciertas realizaciones, el TCR es específico para los aminoácidos preproinsulina humanos 76 a 90 (SLQPLALEGSLQKRG) unidos a DRB1*0401/DRA*0101. En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa es al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 539 o 541, la cadena de TCR beta es al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticos a cualquiera de las SEQ ID NO: 540 o 542.

[0148] En un aspecto adicional, el polinucleótido que codifica TCR α y TCR β codifica adicionalmente una secuencia de salto de ribosomas, cuyos ejemplos no limitantes incluyen una secuencia de salto de ribosomas 2A (por ejemplo, P2A, E2A,

F2A o T2A) o comprende una secuencia IRES. Por lo tanto, en un aspecto, la secuencia de salto de ribosoma comprende una secuencia de salto de ribosoma P2A, E2A, F2A o T2A. En algunas realizaciones, la secuencia de salto de ribosomas 2A
5 comprende el motivo de consenso de Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly-Pro, en donde X representa cualquier aminoácido. Se proporcionan ejemplos no limitantes de secuencias de péptidos 2A en el Listado de Secuencias de ejemplo. Los polinucleótidos pueden comprender además un promotor o una
10 secuencia potenciadora. Se pueden encontrar ejemplos de secuencias de salto ribosómico en el documento WO 2013/057586 que se incorpora como referencia.

[0149] En las Tablas 3 y 4 se proporcionan ejemplos no limitantes de secuencias IRES y secuencias de salto de
15 ribosomas.

[0150] En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa y la cadena de TCR beta se producen como un polipéptido único, y la cadena de TCR alfa y la cadena de TCR beta están separadas por una secuencia de salto de ribosoma con una
20 secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 456 a 523. En ciertas realizaciones, el polipéptido único comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntico a cualquiera de las SEQ ID NO: 524, 526 o 543. En ciertas realizaciones, el

- polipéptido único comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 524, 526. En ciertas realizaciones, el polipéptido único comprende una secuencia
- 5** de aminoácidos al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 524. En ciertas Realizaciones, el polipéptido único comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 526.
- 10** [0151] En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa y la cadena de TCR beta están codificadas por un único polinucleótido y el polinucleótido comprende una secuencia IRES entre la cadena de TCR alfa y la cadena de TCR beta. En ciertas realizaciones, la secuencia IRES comprende una
- 15** secuencia de nucleótidos establecida en una cualquiera de las SEQ ID NO: 524 a 526. En ciertas realizaciones, la cadena de TCR alfa o la cadena de TCR beta están codificadas por un polinucleótido al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% homólogo a la SEQ ID NO: 532 o 557. Este polinucleótido puede
- 20** integrarse de manera estable en el genoma de la célula.
- [0152] El TCR expresado por la célula utilizada en el ensayo de potencia descrito aquí puede ser específico para un antígeno autoinmune o inflamatorio relevante para la enfermedad. En ciertas realizaciones, el antígeno autoinmune

o relevante para la enfermedad es un polipéptido unido a una molécula de MHC. En ciertas realizaciones, el antígeno autoinmune o relevante para la enfermedad es un polipéptido unido a una molécula de MHC de clase I. En ciertas realizaciones, el antígeno autoinmune o relevante para la enfermedad es un polipéptido unido a una molécula MHC de clase II. En ciertas realizaciones, el TCR se une a cualquier antígeno polipeptídico establecido en la Tabla 1.

[0153] El TCR expresado por la célula utilizada en el ensayo de potencia descrito en el presente documento puede ser específico para un antígeno de cáncer. En ciertas realizaciones, el antígeno de cáncer es un polipéptido unido a una molécula de MHC. En ciertas realizaciones, el antígeno de cáncer es un polipéptido unido a una molécula de MHC de clase I. En ciertas realizaciones, el antígeno de cáncer es un polipéptido unido a una molécula MHC de clase II. En ciertas realizaciones, el antígeno de cáncer es un polipéptido expuesto en la Tabla 2.

Marcador Dependiente De TCR

[0154] En algunas realizaciones, el marcador dependiente de la vía TCR es un marcador de la activación de TCR o la activación de la vía TCR. En una realización, el marcador proporciona una o más concentraciones celulares, expresión, actividad, localización, modificación de proteínas o

interacciones proteína-proteína. En algunas realizaciones, el marcador dependiente de la vía TCR comprende, consiste esencialmente, o aún consiste en, una luciferasa, una beta lactamasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), fosfatasa

5 alcalina embrionaria secretada (SEAP), una proteína fluorescente o la combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el marcador dependiente de la vía TCR comprende, consiste esencialmente, o aún consiste en, un factor nuclear de secuencia de ADN de unión al factor de

10 transcripción (NFAT) o promotor, una secuencia de ADN de unión al factor de transcripción NF- κ B o promotor, una secuencia o promotor de ADN de unión al factor de transcripción AP-1, o una secuencia o promotor de ADN de unión al factor de transcripción IL-2. En ciertas

15 realizaciones, la luciferasa comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO: 555. En ciertas realizaciones, la luciferasa está codificada por polinucleótido al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% homólogo a la SEQ ID NO: 556.

20 [0155] El marcador dependiente de TCR es activado por un promotor aguas arriba. En el presente documento se describen ejemplos no limitantes de promotores e incluyen, sin limitación, la secuencia o promotor de ADN de unión al factor de transcripción NFAT, la secuencia o promotor de ADN de

unión al factor de transcripción NF- κ B, la secuencia o promotor de ADN de unión al factor de transcripción AP1 y la transcripción IL-2 secuencia de ADN de unión a factores o promotor. Se proporcionan ejemplos adicionales en el Listado

5 de Secuencias ejemplares. En otro aspecto, el polinucleótido comprende además una secuencia potenciadora.

[0156] En otro aspecto, el marcador dependiente de TCR comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o además consiste en, un marcador cuantificable de producto

10 génico Los ejemplos no limitantes de los marcadores cuantificables de producto génico incluyen, pero no se limitan a, una luciferasa, una beta lactamasa, CAT, SEAP, una proteína fluorescente o la combinación de las mismas. Los ejemplos no limitantes de secuencias de luciferasa para su

15 incorporación como marcador se pueden ubicar en GenBank (por ejemplo, GenBank Nos. de Acceso AAR20792.1, AAL40677.1, AAL40676.1 y AAV35379.1, y equivalentes de cada uno de ellos), último acceso el 12 de enero de 2017. El sistema marcador de luciferasa está disponible comercialmente (por

20 ejemplo, Promega Cat.# E1500 o E4550). Se proporcionan ejemplos adicionales en el Listado de Secuencias ejemplares. Se pueden encontrar ejemplos no limitantes de secuencias de beta lactamasas en GenBank (por ejemplo, los números de acceso de GenBank AMM70781.1, CAA54104.1 y AAA23441.1, y

equivalentes de cada uno de ellos), consultado por última vez el 12 de enero de 2017. No limitante se pueden encontrar ejemplos de "CAT" en GenBank (por ejemplo, números de acceso OCR39292.1, WP_072643749.1, CUB58229.1 y KIX82948.1, y

5 equivalentes de cada uno de ellos), consultado por última vez el 12 de enero de 2017. Codificación de polinucleótidos estos polipéptidos pueden transducirse a la célula. Los ensayos de CAT están disponibles comercialmente (por ejemplo, FAST CAT® Kit de ensayo de cloranfenicol acetiltransferasa (F-2900) de

10 Thermal Fisher). Los ejemplos no limitantes de secuencias SEAP se pueden ubicar en GenBank (por ejemplo, GenBank Nos. de Acceso ADV10306.1, AAB64404.1, EEB84921.1 y EFD 70636.1, y equivalentes de cada uno de ellos), consultado por última vez el 12 de enero de 2017. Los polinucleótidos que codifican

15 estos polipéptidos pueden transducirse a la célula. La actividad SEAP se puede medir con un luminómetro (por ejemplo, el luminómetro de microplacas Veritas de Turner BioSystems de Promega). Los ejemplos no limitantes de proteína fluorescente incluyen proteína fluorescente verde

20 (GFP), proteína fluorescente verde mejorada (eGFP), proteína fluorescente azul (BFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente cian (CFP), proteína fluorescente roja (RFP), o cualquier otra proteína fluorescente adecuada, o combinación de las mismas, o partes

fluorescentes o derivados de la misma. Las secuencias de proteínas fluorescentes se pueden ubicar en GenBank (por ejemplo, Los números de acceso de GenBank AFA52654.1, ACS44348.1 y AAQ96629.1, y equivalentes de cada uno) a los

5 que se accedió por última vez el 12 de enero de 2017. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos pueden transducido a la célula. Los marcadores del promotor de proteínas fluorescentes están disponibles comercialmente (por ejemplo, TakaRa Cat.# 631089).

10 Correceptores de MHC

[0157] Las células transformadas también expresan un correceptor de MHC que se une a un ligando de MHC, por ejemplo, ligandos de MHC de clase I y clase II. En algunas realizaciones, los ligandos de MHC comprenden, consisten o

15 consisten esencialmente en proteína MHC clásica clase I, proteína MHC no clásica clase I, proteína MHC clásica clase II, proteína MHC no clásica clase II, dímeros MHC (fusiones Fc), tetrámeros de MHC, multímeros de MHC o una forma polimérica de una proteína de MHC.

20 [0158] En un aspecto, el correceptor MHC de clase I comprende un complejo CD8. Se pueden ubicar secuencias ejemplares de CD8 en GenBank (por ejemplo, Números de acceso de GenBank AAA92533.1, AJP16706.1, AAA79217.1 y 1203216A, y equivalentes de cada uno de ellos), consultado por última vez

el 19 de enero de 2017. Polinucleótidos que codifican estas proteínas se transducen a la célula usando métodos conocidos en la técnica. Los polinucleótidos pueden ser señales reguladoras acopladas operativamente para la expresión en la superficie celular, potenciadores y también vectores para la transducción y expresión.

[0159] En otro aspecto, el correceptor MHC de clase II comprende una molécula CD4. Se pueden encontrar secuencias de proteínas CD4 ejemplares en GenBank (por ejemplo, números de acceso de GenBank CAA72740.1, AMR44293.1, ACG76115.1, AAC36010.1 y AAB 51309.1, y equivalentes de cada uno de ellos), último acceso el 19 de enero de 2017. Los polinucleótidos que codifican estas proteínas se transducen a la célula usando métodos conocidos en la técnica. Los polinucleótidos pueden ser señales reguladoras operativamente acopladas para la expresión en la superficie celular y también vectores para la transducción y la expresión.

CD3

[0160] En un aspecto adicional, un polinucleótido que codifica moléculas "CD3" (clúster de diferenciación 3) se transduce en la célula y la célula, que carece de CD3 endógeno, ahora expresa la proteína (s). En algunas realizaciones, el CD3 comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o consiste en, cuatro cadenas distintas.

Los ejemplos no limitantes de cadenas CD3 se pueden encontrar en GenBank, por ejemplo, los números de acceso de GenBank CAA72995.1, AAI45927.1, NP_998940.1, AAB24559.1, NP_000723.1, AEQ93556.1 y EAW67366.1 y equivalentes de los mismos, son
5 útiles en esta divulgación. Como es evidente para el experto en la materia, el polinucleótido que codifica CD3 puede estar unido operativamente a elementos reguladores para la expresión de CD3 en la superficie celular, opcionalmente un potenciador, e incluirse dentro de un vector para la
10 expresión de los polinucleótidos. Los polinucleótidos que codifican estas proteínas se transducen a la célula utilizando métodos conocidos en la técnica.

[0161] En una realización, un complejo de señalización de cadena CD3 de múltiples subunidades asociado a TCR
15 comprende, o alternativamente, consiste esencialmente en, o además consiste en, un polipéptido o polipéptidos de cadenas TCR α y β , los polipéptidos CD3 γ , δ y ϵ , y las cadenas ζ . Formando en diferentes módulos, el complejo TCR/CD3 puede llevar diferentes roles. En una realización, el complejo está
20 implicado en el reconocimiento específico de antígeno. En algunas realizaciones, el complejo está implicado en la transducción de señales principalmente a través de la presencia de un motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptor ("ITAM") en las colas citoplasmáticas de las

cadenas CD3. En algunas realizaciones, el complejo TCR/CD3 está implicado en la vía de señalización de TCR estimulada por un antígeno, un superantígeno o un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo receptor). En una realización, la
5 expresión exógena del complejo TCR/CD3 facilita la vía de señalización de TCR en células CD3 negativas.

Receptores Coestimuladores o Citocinas

[0162] En otro aspecto, la célula se transduce con un polinucleótido que codifica un receptor para la molécula
10 coestimuladora o citoquina seleccionada. En el presente documento se proporcionan ejemplos no limitantes de moléculas coestimuladoras y de citoquinas.

Vectores

[0163] Los vectores u otros sistemas de administración de
15 genes pueden usarse para transducir las células con los polinucleótidos como se describió anteriormente. En un aspecto, el término "vector" pretende un vector recombinante que retiene la capacidad de infectar y transducir células que no se dividen o que se dividen lentamente e integrarse en el
20 genoma de la célula objetivo. En varios aspectos, el vector se deriva o se basa en un virus o plásmido de tipo salvaje, por ejemplo, un plásmido. En otros aspectos, el vector se deriva o se basa en un lentivirus de tipo salvaje. Ejemplos de tales, incluyen sin limitación, virus de inmunodeficiencia

humana (VIH), virus de anemia infecciosa equina (EIAV), virus de inmunodeficiencia simia (SIV) y virus de inmunodeficiencia felina (FIV). Alternativamente, se contempla que se pueda usar otro retrovirus como base para un esqueleto de vector tal como el virus de la leucemia murina (MLV). Será evidente que un vector viral de acuerdo con la invención no necesita limitarse a los componentes de un virus particular. El vector viral puede comprender componentes derivados de dos o más virus diferentes, y también puede comprender componentes sintéticos. Los componentes del vector se pueden manipular para obtener las características deseadas, como la especificidad de la célula objetivo.

[0164] Los vectores recombinantes de esta descripción pueden derivarse de primates y no primates. Los ejemplos de lentivirus de primates incluyen el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causante del síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA) y el virus de la inmunodeficiencia simia (SIV). El clúster lentiviral no de primates incluye el prototipo de "virus lento" de virus visna/maedi (VMV), así como el virus de la encefalitis caprina relacionada con la artritis (CAEV), el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) y el virus de inmunodeficiencia felina descrito más recientemente (FIV) y el virus de inmunodeficiencia bovina (BIV). Los vectores

lentivirales recombinantes de la técnica anterior son conocidos en la técnica, por ejemplo, véanse las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,924,123; 7,056,699; 7,07,993; 7,419,829 and 7,442,551, incorporadas aquí como referencia.

- 5** [0165] La Patente de Estados Unidos No. 6.924.123 describe que cierta secuencia retroviral facilita la integración en el genoma de la célula diana. Esta patente enseña que cada genoma retroviral comprende genes llamados gag, pol y env que codifican proteínas y enzimas de virión.
- 10** Estos genes están flanqueados en ambos extremos por regiones llamadas repeticiones terminales largas (LTR). Los LTR son responsables de la integración proviral y la transcripción. También sirven como secuencias potenciadoras-promotoras. En otras palabras, los LTR pueden controlar la expresión de los
- 15** genes virales. La encapsidación de los ARN retrovirales se produce en virtud de una secuencia psi ubicada en el extremo 5'del genoma viral. Los LTR son secuencias idénticas que se pueden dividir en tres elementos, que se denominan U3, R y U5. U3 se deriva de la secuencia exclusiva del extremo 3'del
- 20** ARN. R se deriva de una secuencia repetida en ambos extremos del ARN, y U5 se deriva de la secuencia única para el extremo 5'del ARN. Los tamaños de los tres elementos pueden variar considerablemente entre diferentes retrovirus. Por el genoma viral. y el sitio de adición de poli (A) (terminación) está

en el límite entre R y U5 en el lado derecho LTR. U3 contiene la mayoría de los elementos de control de la transcripción del provirus, que incluyen las secuencias promotoras y potenciadoras múltiples que responden a las proteínas
5 activadoras de la transcripción celular y, en algunos casos, viral.

[0166] Con respecto a los genes estructurales gag, pol y env, gag codifica la proteína estructural interna del virus. La proteína Gag se procesa proteolíticamente en las proteínas
10 maduras MA (matriz), CA (cápside) y NC (nucleocápside). El gen pol codifica la transcriptasa inversa (RT), que contiene ADN polimerasa, RNasa H e integrasa (IN) asociadas, que median la replicación del genoma.

[0167] Para la producción de partículas virales del
15 vector, el genoma del ARN del vector se expresa a partir de una construcción de ADN que lo codifica, en una célula huésped. Los componentes de las partículas no codificadas por el genoma del vector se proporcionan en trans mediante secuencias de ácido nucleico adicionales (el "sistema de
20 empaquetamiento", que generalmente incluye uno o ambos genes gag/pol y env) expresados en la célula huésped. El conjunto de secuencias requeridas para la producción de las partículas del vector viral puede introducirse en la célula huésped por transfección transitoria, o pueden integrarse en el genoma de

la célula huésped, o pueden proporcionarse de una manera mixta. Las técnicas involucradas son conocidas por los expertos en la materia.

[0168] En una realización, el vector es un vector viral.

5 En una realización relacionada, el vector viral se selecciona del clúster que consiste en, un vector lentiviral, un vector retroviral, un vector de adenovirus, un vector de virus adenoasociado y un vector de alfavirus. En otra realización más, el vector viral es un vector lentiviral.

10 [0169] Los vectores no virales pueden incluir un plásmido que comprende un polinucleótido heterólogo capaz de ser entregado a una célula diana, in vitro, in vivo o ex vivo. El polinucleótido heterólogo puede comprender una secuencia de interés y puede estar operativamente unido a uno

15 o más elementos reguladores y puede controlar la transcripción de la secuencia de ácido nucleico de interés. Como se usa en este documento, un vector no necesita ser capaz de replicarse en la célula o sujeto objetivo final.

[0170] En una realización, los elementos reguladores

20 adicionales son promotores, potenciador o combinaciones de promotor/potenciador. El promotor que regula la expresión del ácido nucleico que codifica la proteína VEGF puede ser un promotor constitutivo. En un aspecto, el promotor que regula la expresión del gen suicida es un promotor constitutivo.

Ejemplos no limitativos de promotores constitutivos incluyen SFFV, CMV, PKG, MDNU3, SV40, Efla, UBC y CAGG. En un aspecto, el potenciador es un elemento post-regulador Woodchuck ("WPRE") (véase, por ejemplo, Zufferey, R. y col. (1999) J. Virol. 73 (4): 2886-2992).

[0171] Los promotores útiles en esta descripción pueden ser constitutivos o inducibles. Algunos ejemplos de promotores incluyen el promotor temprano SV40, el promotor LTR del virus de tumor mamario de ratón, el promotor tardío principal de adenovirus, el promotor del virus del herpes simple y el promotor CMV. En una realización, el promotor que regula la expresión de la proteína activadora de tetraciclina es un promotor constitutivo. En otras realizaciones, el promotor es un promotor inducible, un promotor específico de tejido o un promotor que regula la expresión temporalmente. En una realización, el promotor es un promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK).

[0172] En un aspecto adicional, el vector comprende además un marcador o marcador detectable tal como un gen que codifica una proteína fluorescente verde mejorada (EGFP), proteína fluorescente roja (RFP), proteína fluorescente verde (GFP) y proteína fluorescente amarilla (YFP).) o similar. Estos están disponibles comercialmente y se describen en la técnica.

[0173] Otros métodos para administrar genes de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, transfección con fosfato cálcico, transfección con DEAE-dextrano, electroporación, microinyección, fusión de
5 protoplastos o transfección mediada por liposomas. Las células huésped que se transfectan con los vectores de esta invención pueden incluir (pero no se limitan a) E. coli u otras bacterias, levaduras, hongos, células de insectos (usando, por ejemplo, vectores baculovirales para la
10 expresión en células de insecto SF9), o células derivadas de ratones, humanos u otros animales (por ejemplo, mamíferos). También se puede usar la expresión in vitro de una proteína, fusión, fragmento de polipéptido o mutante codificado por ADN clonado. Los expertos en la técnica de la biología molecular
15 comprenderán que se puede usar una amplia variedad de sistemas de expresión y sistemas de purificación para producir proteínas recombinantes y fragmentos de las mismas.

Poblaciones Celulares

[0174] En un aspecto, la divulgación se refiere a una
20 población celular aisladas, que incluyen, pero no se limitan a las células en esta divulgación, por ejemplo, JurMA, Jurkat, BW5147, HuT-78, CEM, Molt-4 que se modifican como se describe Aquí en. En otro aspecto, las células son células CD3 negativas. Los ejemplos no limitantes de células CD3

negativas incluyen, entre otros, BW5147 (ATCC No. TIB-472), Nk-92 (ATCC No. CRL-2407), Mino (ATCC No. PTS-CRL-3000) y JeKo-1 (ATCC No. CRL-3006). En algunas realizaciones, la población es sustancialmente homogénea. En otra realización, la población es sustancialmente heterogénea. En ciertas realizaciones, una población es una pluralidad de células de esta descripción. En ciertas realizaciones, una población comprende al menos 1×10^2 a 1×10^9 células que son al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 95, 95%, 98% o 99% puro.

10 Monitoreo De Expresión

[0175] Como es evidente para el experto en la materia, la expresión efectiva del polipéptido transducido puede determinarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando anticuerpos marcados detectables o fragmentos de los mismos que pueden monitorizarse cuantitativa o cualitativamente después de la transducción y el cultivo en las células y poblaciones celulares.

Métodos Para Preparar Las Células

[0176] En otro aspecto, la divulgación también se refiere a métodos para preparar la célula aislada, que comprenden, o consisten esencialmente en, o aún consisten en, transducir una célula aislada con uno o más polinucleótidos que codifican: un receptor de células T recombinante (TCR), un marcador dependiente de la vía TCR y un correceptor de MHC.

En un aspecto adicional, el método incluye además transducir la célula con un polinucleótido que codifica un complejo de señalización de cadena de CD3 de múltiples subunidades asociado a TCR, o una molécula coestimuladora o una citocina.

- 5** En alguna realización, los métodos comprenden además, consisten esencialmente en, o aún consisten en, cultivar las células en condiciones que favorecen la expresión de uno o más polinucleótidos transducidos, p. un polinucleótido que codifica el receptor de células T recombinante (TCR), el
- 10** marcador dependiente de la vía TCR, el correceptor que une los ligandos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I o clase II, opcionalmente una señalización de cadena CD3 de múltiples subunidades asociada a TCR complejo, la molécula coestimuladora o la citocina. En una realización,
- 15** los métodos comprenden, además, consisten esencialmente en, o todavía consisten en, aislar las células que expresan el receptor de células T recombinante (TCR), el marcador dependiente de la vía TCR, el correceptor que se une a la clase I o clase II ligandos del complejo mayor de
- 20** histocompatibilidad (MHC), u opcionalmente un complejo de señalización de cadena CD3 de múltiples subunidades asociado a TCR, y además opcionalmente la molécula coestimuladora o la citocina. En una realización, las células se aíslan mediante un método que comprende citometría de flujo. Las células

aisladas se cultivan en condiciones de expansión y la expresión continua de los polinucleótidos transducidos proporciona una población celular.

[0177] En ciertos aspectos, la descripción se refiere a métodos in vitro para medir la potencia de las moléculas de pMHC que están opcionalmente acopladas a núcleos de nanopartículas. Los métodos comprenden, o alternativamente consisten esencialmente, o consisten en: (a) poner en contacto una célula transducida que expresa un receptor de células T (TCR) y un marcador dependiente de la vía TCR y un correceptor que se une a un ligando MHC, con una cantidad efectiva de una composición que comprende pMHC, y (b) detectar dicho marcador dependiente de la vía TCR o una señal de dicho marcador. En un aspecto adicional, las células comprenden además un complejo CD3 o un receptor coestimulador, o un receptor de citocina.

[0178] En otra realización, el contacto es in vitro.

[0179] En una realización, al menos un pMHC en el complejo interactúa con el TCR, en el que la interacción activa la vía dependiente de TCR. En algunas realizaciones, el marcador dependiente de la vía TCR es un marcador de la activación de TCR o la activación de la vía TCR. En una realización, la característica del marcador comprende concentración celular, expresión, actividad, localización,

modificación de proteínas o interacciones proteína-proteína. En una realización, el marcador es un marcador natural, intrínseco al tipo de célula efectora, que tiene una característica que es detectable y se correlaciona con la
5 activación de TCR, o la activación de la vía TCR. En algunas realizaciones, el marcador es un marcador artificial, exógeno al tipo de célula efectora, que tiene una característica que es detectable y se correlaciona con la activación de TCR o la activación de la vía TCR.

10 [0180] En algunas realizaciones, las células aisladas son como se describió anteriormente, por ejemplo, células efectoras que comprenden una o más de células T JurMA, Jurkat, BW5147, HuT-78, CEM, Molt-4 o primarias. Los ejemplos no limitantes de células CD3 negativas incluyen, entre otros,
15 BW5147 (ATCC No. TIB-472), Nk-92 (ATCC No. CRL-2407), Mino (ATCC No. PTS-CRL-3000) y JeKo-1 (ATCC No. CRL-3006).

[0181] En una realización, el marcador dependiente de la vía TCR comprende, consiste esencialmente en, o aún consiste en, un gen que codifica una proteína seleccionada del clúster
20 que consiste en, una luciferasa (luciérnaga o Renilla), una beta lactamasa, CAT, SEAP, una proteína fluorescente y un producto génico cuantificable. En algunas realizaciones, el marcador dependiente de la vía TCR comprende, consiste esencialmente, o aún consiste en, un factor nuclear de

- secuencia de ADN de unión al factor de transcripción (NFAT) o promotor, una secuencia de ADN de unión al factor de transcripción NF- κ B o promotor, una secuencia de ADN o promotor de unión al factor de transcripción AP-1, o una
- 5** secuencia o promotor de ADN de unión al factor de transcripción IL-2. En una realización, el marcador comprende, consiste esencialmente en, o aún consiste en, un gen, cuya expresión está bajo el control de la vía dependiente de la vía TCR.
- 10** [0182] En una realización, un complejo de señalización de cadena CD3 de múltiples subunidades asociado a TCR comprende, o alternativamente, consiste esencialmente en, o además consiste en, un polipéptido o polipéptidos de cadenas TCR α y β , los polipéptidos CD3 γ , δ y ϵ , y las cadenas ζ .
- 15** Formando en diferentes módulos, el complejo TCR/CD3 puede llevar diferentes roles. En una realización, el complejo está implicado en el reconocimiento específico de antígeno. En algunas realizaciones, el complejo está implicado en la transducción de señales principalmente a través de la
- 20** presencia de un motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptor ("ITAM") en las colas citoplasmáticas de las cadenas CD3. En algunas realizaciones, el complejo TCR/CD3 está implicado en la vía de señalización de TCR estimulada por un antígeno, un superantígeno o un anticuerpo (por

ejemplo, anticuerpo anti receptor). En una realización, la expresión exógena del complejo TCR/CD3 facilita la vía de señalización de TCR en células CD3 negativas. Los ejemplos no limitantes de células CD3 negativas incluyen, entre otros,

5 BW5147 (ATCC No. TIB-472), Nk-92 (ATCC No. CRL-2407), Mino (ATCC No. PTS-CRL-3000) y JeKo-1 (ATCC No. CRL-3006). En otro aspecto, las células expresan endógenamente receptores para una citocina o por separado, una molécula coestimuladora.

Usos Del Ensayo De Potencia

10 [0183] En un aspecto, el ensayo de potencia puede medir la potencia, pureza o actividad de las nanopartículas de pMHC. El ensayo se puede usar como, por ejemplo, un paso de control de calidad para controlar diferentes lotes o lotes de pMHC-NP para verificar que el lote comprende pMHC en funcionamiento

15 capaz de unirse a las células T o inducir la respuesta inmune deseada. En un aspecto, el ensayo de potencia puede medir la actividad de las nanopartículas de pMHC, que opcionalmente comprenden, o consisten adicionalmente en las mismas, o alternativamente consisten esencialmente en una o más

20 moléculas coestimuladoras o una o más citocinas acopladas al núcleo de nanopartículas.

[0184] Para las nanopartículas que se pueden analizar en el ensayo, los complejos de pMHC en cada núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o el MHC de

- los complejos pMHC en cada núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o las citocinas en cada núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o las moléculas coestimuladoras en cada núcleo de nanopartículas
- 5** son iguales o diferentes entre sí; o los diámetros de los núcleos de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o la valencia de los complejos pMHC en cada núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o la densidad de los complejos de pMHC en cada núcleo de
- 10** nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o la valencia o la densidad de las moléculas coestimuladoras en cada núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o la valencia o la densidad de las citocinas en cada núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí.
- 15** En un aspecto, se analiza una composición en la que la composición comprende nanopartículas que tienen una pluralidad del complejo de pMHC y luego una pluralidad separada de nanopartículas que tienen coestimuladores y opcionalmente citocinas. Como anteriormente, los complejos
- 20** pMHC en cada núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o el MHC de los complejos pMHC en cada núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o las citocinas en cada núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o las moléculas coestimuladoras en cada

núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o los diámetros de los núcleos de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o la valencia de los complejos pMHC en cada núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre
5 sí; o la densidad de los complejos de pMHC en cada núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí; o la valencia o la densidad de las moléculas coestimuladoras en cada núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre
10 sí; o la valencia o la densidad de las citocinas en cada núcleo de nanopartículas son iguales o diferentes entre sí.

[0185] En ciertos aspectos, las nanopartículas que se pueden probar en el ensayo de las nanopartículas se proporcionan en una composición que comprende una pluralidad de los complejos de nanopartículas proporcionados aquí. En
15 algunas realizaciones, las composiciones comprenden además un vehículo, opcionalmente un vehículo farmacéutico.

[0186] El ensayo puede usarse para determinar la potencia de pMHC que está opcionalmente acoplada a nanopartículas, por ejemplo, nanopartículas de pMHC. Los
20 términos "partículas", "nanopartículas", "micropartículas", "microesferas", "microesferas" y equivalentes gramaticales de los mismos en este documento se aplican a pequeñas partículas discretas que se pueden administrar a un sujeto. En ciertas realizaciones, las partículas tienen una forma

sustancialmente esférica. El término "sustancialmente esférico", como se usa en este documento, significa que la forma de las partículas no se desvía de una esfera en más de aproximadamente 10%. Se pueden aplicar diversos complejos conocidos de antígeno o péptido de la descripción a las partículas.

[0187] Las nanopartículas de péptido MHC que son compatibles y pueden analizarse usando el ensayo de potencia descrito en el presente documento son al menos las descritas, a modo de ejemplo no limitativo, WO 2008/109852, WO 2012/041968, WO 2012/062904, WO 2013144811, WO 2014/050286, WO 2015/063616, WO 2016/198932 o PCT/IB2017/001508, todos los cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

[0188] El ensayo de potencia descrito en el presente documento puede usarse para cuantificar una señal de una célula que al menos se ha transducido con un TCR recombinante y un marcador dependiente de la vía. La cuantificación de la señal puede ser realizada y utilizada de muchas maneras por los expertos en la materia. En ciertas realizaciones, la señal puede cuantificarse y compararse con un umbral preestablecido para determinar si una preparación dada de una nanomedicina o nanopartícula pasa un paso de control de calidad. El umbral puede ser al menos aproximadamente 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 70%, 800%, 900% o 1,000% de la

señal cuantificada de un control negativo. Un control negativo puede ser, por ejemplo, una célula con un TCR recombinante y que carece de un marcador del tipo cuantificado; o una nanomedicina o nanopartícula que
5 comprende un complejo de péptido MHC irrelevante o ningún complejo de péptido MHC. En ciertas realizaciones, el ensayo de potencia se puede usar para definir una IC50 de una preparación particular de nanopartículas.

Composiciones De Núcleo Y Capa De Nanopartículas

10 [0189] El núcleo de nanopartículas del pMHC-NP comprende, o consiste esencialmente en, o además consiste en, un núcleo, por ejemplo, un núcleo sólido, un núcleo de metal, un núcleo de dendrímero, un núcleo de nanopartículas de micelas poliméricas, un nanorod, un fullereno, una nanocapa, una capa
15 central, una nanoestructura basada en proteínas o una nanoestructura basada en lípidos. En algunos aspectos, el núcleo de nanopartículas es bioabsorbible o biodegradable. En algunos aspectos, el núcleo de nanopartículas es un núcleo de nanopartículas de dendrímero que comprende, o
20 alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o que consiste además en una macromolécula altamente ramificada que tiene una estructura similar a un árbol que crece desde un núcleo. En aspectos adicionales, el núcleo de nanopartículas de dendrímero puede comprender, o alternativamente consistir

esencialmente en el mismo, o además consistir en un dendrímero basado en poli (amidoamina) o un dendrímero basado en poli-L-lisina. En ciertos aspectos, el núcleo de nanopartículas es un núcleo micelar polimérico que comprende, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o que consiste además en un copolímero de bloque anfifílico ensamblado en una estructura de cubierta de núcleo nanoescalada. En aspectos adicionales, el núcleo de micela polimérica comprende, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en, una micela polimérica producida usando copolímero de bloques de polietilenglicol-diastearoilfosfatidiletanolamina. En un aspecto adicional, el núcleo de nanopartículas comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o además consiste en, un metal. En otro aspecto, el núcleo de nanopartículas no es un liposoma. Ejemplos adicionales de materiales de núcleo incluyen, entre otros, vidrios estándar y especiales, sílice, poliestireno, poliéster, policarbonato, polímeros acrílicos, poliacrilamida, poliacrilonitrilo, poliamida, fluoropolímeros, silicona, celulosas, silicio, metales (por ejemplo, hierro, oro, plata), minerales (por ejemplo, rubí), nanopartículas (por ejemplo, nanopartículas de oro, partículas coloidales, óxidos metálicos, sulfuros metálicos, seleniuros metálicos y materiales magnéticos como el óxido de

hierro) y sus compuestos. En algunas realizaciones, un núcleo de nanopartículas de óxido de hierro comprende óxido de hierro (II, III). El núcleo podría ser de composición homogénea, o un compuesto de dos o más clases de material

5 dependiendo de las propiedades deseadas. En ciertos aspectos, se utilizarán nanopartículas metálicas. Estas partículas metálicas o nanopartículas pueden formarse a partir de Au, Pt, Pd, Cu, Ag, Co, Fe, Ni, Mn, Sm, Nd, Pr, Gd, Ti, Zr, Si e In, sus precursores, sus aleaciones binarias, sus aleaciones

10 ternarias y sus compuestos intermetálicos. Véase la Patente de los Estados Unidos No. 6,712,997, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. En ciertas realizaciones, las composiciones del núcleo y las capas (descritas a continuación) pueden variar siempre que las nanopartículas

15 sean biocompatibles y bioabsorbibles. El núcleo podría ser de composición homogénea o un compuesto de dos o más clases de material dependiendo de las propiedades deseadas. En ciertos aspectos, se utilizarán nanoesferas metálicas. Estas nanopartículas metálicas pueden formarse a partir de Fe, Ca,

20 Ga y similares. En ciertas realizaciones, la nanopartícula comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o además consiste en, un núcleo que comprende metal u óxido metálico tal como oro u óxido de hierro. En algunas realizaciones, una pluralidad de moléculas coestimuladoras o

una pluralidad de citocinas están acopladas a un núcleo de dendrímero de nanopartículas o núcleo de micelas poliméricas.

[0190] Las partículas consisten típicamente en un núcleo sustancialmente esférico y opcionalmente una o más capas o recubrimientos. El núcleo puede variar en tamaño y composición como se describe aquí. Además del núcleo, la partícula puede tener una o más capas para proporcionar funcionalidades apropiadas para las aplicaciones de interés. El espesor de las capas, si está presente, puede variar según las necesidades de las aplicaciones específicas. Por ejemplo, las capas pueden impartir propiedades ópticas útiles.

[0191] Las capas también pueden impartir funcionalidades químicas o biológicas, denominadas aquí como capas químicamente activas o biológicamente activas. Estas capas se aplican típicamente en la superficie externa de la partícula y pueden impartir funcionalidades a los pMHC-NP. La capa o capas pueden variar típicamente en grosor de aproximadamente 0.001 micrómetros (1 nanómetro) a aproximadamente 10 micrómetros o más (dependiendo del diámetro de partícula deseado) o de aproximadamente 1 nm a 5 nm, o alternativamente de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 10 nm, o alternativamente de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 40 nm, o de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 25 nm, o de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 20 nm, y oscila entre

ellos.

[0192] La capa o revestimiento puede comprender, o alternativamente consistir esencialmente en, o además consistir en un azúcar biodegradable u otro polímero. Los
 5 ejemplos de capas biodegradables incluyen, pero no se limitan a, dextrano; polietilenglicol); poli (óxido de etileno); manitol; poli (ésteres) basados en polilactida (PLA), poliglicólido (PGA), policaprolactona (PCL); poli (hidroxalcanoato) de la clase PHB-PHV; y otros poli
 10 (sacáridos) modificados tales como almidón, celulosa y quitosano. Además, la nanopartícula puede incluir una capa con superficies adecuadas para unir funcionalidades químicas para sitios de unión o acoplamiento químico.

[0193] Se pueden producir capas en las nanopartículas de
 15 una variedad de formas conocidas por los expertos en la materia. Los ejemplos incluyen técnicas de química de sol-gel como las descritas en Iler, Chemistry of Silica, John Wiley & Sons, 1979; Brinker y Scherer, Sol-gel Science, Academic Press, (1990). Los enfoques adicionales para producir capas
 20 en nanopartículas incluyen la química de la superficie y las técnicas de encapsulación, como se describe en Partch y Brown, J. Adhesion, 67: 259-276, 1998; Pekarek y col., Nature, 367: 258, (1994); Hanprasopwattana, Langmuir, 12: 3173-3179, (1996); Davies, Advanced Materials, 10:1264-1270,

(1998); y referencias en el mismo. También se pueden usar técnicas de deposición de vapor; ver, por ejemplo, Golman y Shinohara, Trends Chem. Engin., 6:1-6, (2000); y la patente de EE.UU. No. 6.387.498. Aún otros enfoques incluyen técnicas de autoensamblaje capa por capa, como se describe en Sukhorukov et al., Polymers Adv. Tech., 9 (10-11): 759-767, (1998); Caruso y col., Macromolecules, 32 (7): 2317-2328, (1998); Caruso y col., J. Amer. Chem Soc., 121 (25): 6039-6046, (1999); Pat. No. 6.103.379 y referencias citadas en el mismo.

[0194] Las nanopartículas pueden comprender, consistir esencialmente en, o además consistir en un núcleo de nanopartículas acoplado a una pluralidad del complejo antígeno-MHC relevantes para la enfermedad que son útiles para expandir y diferenciar las poblaciones de células T y tratar la enfermedad cuando se administra de manera efectiva equivale a un sujeto. En algunos aspectos, el número de pMHC por núcleo de nanopartículas (denominado en el presente documento "valencia" del complejo de nanopartículas) que tiene una variedad de rangos como se describe anteriormente e incorporado como referencia en el presente documento.

[0195] En algunos aspectos, el núcleo de nanopartículas es un núcleo de nanopartículas de dendrímero que comprende, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o que

consiste además en una macromolécula altamente ramificada que tiene una estructura similar a un árbol que crece desde un núcleo. En aspectos adicionales, la nanopartícula de dendrímero puede comprender, o alternativamente consistir

5 esencialmente en ella, o además consistir en un dendrímero basado en poli (amidoamina) o un dendrímero basado en poli-L-lisina. En ciertos aspectos, el núcleo de nanopartículas es un núcleo micelar polimérico que comprende, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o que

10 consiste además en un copolímero de bloque anfifílico ensamblado en una estructura de cubierta de núcleo nanoescalada. En aspectos adicionales, el núcleo de micela polimérica puede comprender, o alternativamente consistir esencialmente en el mismo, o consistir aún más en una micela

15 polimérica producida usando copolímero de bloques de polietilenglicol-diastearoilfosfatidiletanolamina. El núcleo de dendrímero o el núcleo de micelas poliméricas pueden comprender además un recubrimiento o capa externa como se describe en este documento.

20 [0196] En ciertas realizaciones, los medios específicos de síntesis de nanopartículas de dendrímeros o nanopartículas con un núcleo de nanopartículas de dendrímero pueden requerir que los iones metálicos se extraigan en el interior de los dendrímeros y luego se reduzcan químicamente para producir

partículas monodispersas de tamaño casi inferior que tienen dimensiones inferiores a 3 nm, como el método descrito en Crooks et al., "Síntesis, caracterización y aplicaciones de nanopartículas encapsuladas en dendrímero". The Journal of Physical Chemistry B (109): 692-704 (2005), en el que el núcleo de dendrímero resultante El componente sirve no solo como plantilla para preparar la nanopartícula, sino también para estabilizar la nanopartícula, lo que permite ajustar la solubilidad y proporciona un medio para la inmovilización de la nanopartícula en soportes sólidos. En algunas realizaciones, una pluralidad de moléculas coestimuladoras o una pluralidad de citocinas están acopladas a un núcleo de dendrímero de nanopartículas o núcleo de micelas poliméricas.

[0197] El tamaño del núcleo de nanopartículas puede variar de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1 μ m. En ciertas realizaciones, el núcleo de nanopartículas tiene menos de aproximadamente 1 μ m de diámetro. En otras realizaciones, el núcleo de nanopartículas tiene menos de aproximadamente 500 nm, menos de aproximadamente 400 nm, menos de aproximadamente 300 nm, menos de aproximadamente 200 nm, menos de aproximadamente 100 nm o menos de aproximadamente 50 nm de diámetro. En realizaciones adicionales, el núcleo de nanopartículas tiene un diámetro de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 10 nm, 15 nm, 20 nm,

25 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 75 nm o 100 nm. En realizaciones específicas, el núcleo de nanopartículas tiene un diámetro de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm; de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 75 nm; de

5 aproximadamente 1 nm a aproximadamente 50 nm; de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 25 nm; de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 25 nm; de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 100 nm; de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 50 nm; de

10 aproximadamente 5 nm a aproximadamente 25 nm; de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 25 nm; o aproximadamente 20 nm. En algunas realizaciones, el núcleo de nanopartículas tiene un diámetro de aproximadamente 25 nm a aproximadamente 60 nm, o de aproximadamente 25 nm a

15 aproximadamente 50 nm, o de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 40 nm, o de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 50 nm, o de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 40 nm, o de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 35 nm, o de aproximadamente 15 nm a

20 aproximadamente 30 nm, o de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 25 nm, o alternativamente de aproximadamente 15 nm, o aproximadamente 20 nm, o aproximadamente 25 nm, o aproximadamente 30 nm, o aproximadamente 35 nm, o aproximadamente 40 nm.

[0198] El tamaño del pMHC-NP, con o sin la capa, puede variar de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 1 μ m de diámetro. En ciertas realizaciones, el complejo pMHC-NP tiene menos de aproximadamente 1 μ m o, alternativamente, menos de

5 100 nm de diámetro. En otras realizaciones, el complejo pMHC-NP tiene menos de aproximadamente 500 nm, menos de aproximadamente 400 nm, menos de aproximadamente 300 nm, menos de aproximadamente 200 nm, menos de aproximadamente 100 nm o menos de aproximadamente 50 nm de diámetro. En

10 realizaciones adicionales, el complejo es de aproximadamente 5 nm o 10 nm a aproximadamente 50 nm, o de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 75 nm, o de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 50 nm, o de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 60 nm, o de aproximadamente 10 nm a

15 aproximadamente 50 nm, o de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 60 nm, o de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 70 nm, o de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 75 nm, o de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 50 nm, o de aproximadamente 20 nm a

20 aproximadamente 60 nm, o de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 70 nm, o de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 75 nm, o de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 50 nm, o de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 60 nm, o de aproximadamente 30 nm a

aproximadamente 70 nm, o de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 75 nm, o en un aspecto de aproximadamente 55 nm de diámetro. En realizaciones específicas, el complejo pMHC-NP es de aproximadamente 35 nm a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 35 nm a aproximadamente 70 nm, o de aproximadamente 35 nm a aproximadamente 75 nm de diámetro. En un aspecto, el complejo pMHC-NP tiene un diámetro de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 50 nm002E

Complejos Antígeno-MHC

- 10** [0199] Las nanopartículas comprenden un núcleo de nanopartículas, con o sin una capa, acoplado a un complejo antígeno-MHC (pMHC). Los antígenos se seleccionan para el tratamiento del trastorno autoinmune particular, alérgico, enfermedad infecciosa o cáncer.
- 15** [0200] El polipéptido individual (por ejemplo, MHC) y los componentes antigénicos (por ejemplo, péptido) forman un complejo a través de la unión covalente o no covalente (por ejemplo, a través de enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos o enlaces hidrófobos). La preparación de tales complejos puede
- 20** requerir diversos grados de manipulación y dichos métodos son bien conocidos en la literatura. En algunos aspectos, los componentes antigénicos pueden asociarse de manera no covalente con la porción de bolsillo del componente MHC, por ejemplo, mezclando el MHC y los componentes antigénicos; esto

se basa en la afinidad de unión natural entre un MHC y un antígeno. Alternativamente, en algunos aspectos, el componente MHC puede unirse covalentemente al componente antigénico utilizando procedimientos estándar, que incluyen, pero no se limitan a, la introducción de agentes de acoplamiento conocidos o etiquetado de fotoafinidad (véase, por ejemplo, Hall et al., Biochemistry 24: 5702-5711 (1985)). En ciertos aspectos, un componente antigénico se puede acoplar operativamente al componente MHC a través de enlaces peptídicos u otros métodos discutidos en la literatura, que incluyen, pero no se limitan a, la unión a través de clústers de carbohidratos en las glucoproteínas, que incluyen, por ejemplo, los restos de carbohidratos de las cadenas alfa o beta. En realizaciones particulares, el componente antigénico puede estar unido al extremo N-terminal o C-terminal de una molécula de MHC apropiada. Alternativamente, en ciertas realizaciones, el complejo MHC puede formarse de manera recombinante incorporando la secuencia del componente antigénico en una secuencia que codifica un MHC, de modo que ambos conserven sus propiedades funcionales.

[0201] Los complejos múltiples antígeno-MHC pueden estar acoplados al mismo núcleo de nanopartículas; estos complejos, MHC o antígenos pueden ser iguales o diferentes entre sí y el número de pMHC por núcleo de nanopartículas (denominado en el

presente documento "valencia" del complejo de nanopartículas) que tiene una variedad de rangos como se describe aquí. La valencia puede variar entre aproximadamente 1 complejo de pMHC a 1 núcleo de nanopartículas (1:1) a aproximadamente

5 6000 complejos de pMHC a 1 núcleo de nanopartículas (6000:1), o alternativamente entre aproximadamente 8:1 a aproximadamente 6000:1, o alternativamente entre aproximadamente 10:1 a 6000:1; o alternativamente de aproximadamente 11:1 a aproximadamente 6000:1, o

10 alternativamente entre aproximadamente 12:1 a aproximadamente 6000:1, o alternativamente al menos 2:1, o alternativamente al menos 8:1, o alternativamente al menos 9:1, o alternativamente al menos 10:1, o alternativamente al menos 11:1, o alternativamente al menos 12:1. En algunos aspectos,

15 la valencia es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 6000:1, o de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 5500:1, o alternativamente de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 5000:1, o alternativamente de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 4000:1, o alternativamente de aproximadamente

20 10:1 a aproximadamente 3500:1, o alternativamente de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 3000:1, o alternativamente de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 2500:1, o alternativamente de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 2000:1, o alternativamente de aproximadamente

10:1 a aproximadamente 1500:1, o alternativamente de aproximadamente 10:1 a 1000:1, o alternativamente de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 500:1, o alternativamente de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 100:1, o alternativamente de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 50:1, o alternativamente de aproximadamente 25:1 a aproximadamente 60:1, o alternativamente de aproximadamente 30:1 a aproximadamente 50:1, o alternativamente desde aproximadamente 35:1 hasta aproximadamente 45:1, o alternativamente aproximadamente 40:1. En otro aspecto, la valencia de los complejos de pMHC por núcleo de nanopartículas es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 100:1, o alternativamente de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1000:1, o alternativamente de 8:1 a 10:1, o alternativamente de 13:1 a 50:1.

[0202] El solicitante también ha descubierto que la densidad de pMHC en la nanopartícula regula la capacidad de los pMHC-NP para desencadenar o diferenciar la formación de células TR1 de una manera independiente de la dosis. La densidad se calcula como el número de complejos por unidad de superficie de la nanopartícula. El área superficial de la nanopartícula se puede determinar con o sin las capas, incluidos, entre otros, los enlazadores que conjugan el complejo pMHC con la nanopartícula. Para el cálculo de la

densidad, el valor del área superficial relevante se basa en el diámetro final de la construcción de partículas sin el complejo pMHC, con o sin la capa externa en el núcleo de nanopartículas.

- 5** [0203] En estos aspectos, la densidad de pMHC por nanopartícula es de aproximadamente 0.025 pMHC/100 nm² a aproximadamente 100 pMHC/100 nm² del área superficial del núcleo de nanopartículas, o alternativamente de aproximadamente 0.406 pMHC/100 nm² a aproximadamente 50
- 10** pMHC/100 nm², o alternativamente de aproximadamente 0.05 pMHC/100 nm² a aproximadamente 25 pMHC/100 nm². En ciertos aspectos, la densidad de pMHC por nanopartícula es de aproximadamente 0.2 pMHC/100 nm² a aproximadamente 25 pMHC/100 nm², o de aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² a
- 15** aproximadamente 20 pMHC/100 nm², o de aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² a aproximadamente 15 pMHC/100 nm², o desde aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² hasta aproximadamente 14 pMHC/100 nm², o desde aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² hasta aproximadamente 13 pMHC/100 nm², o desde aproximadamente 0.4
- 20** pMHC/100 nm² hasta aproximadamente 12 pMHC/100 nm², o de aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² a aproximadamente 11.6 pMHC/100 nm², o de aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² a aproximadamente 11.5 pMHC/100 nm², o de aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² a aproximadamente 11 pMHC/100 nm², o de

aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² a aproximadamente 10 pMHC/100 nm², o de aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² a aproximadamente 9 pMHC/100 nm², o de aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² a aproximadamente 8 pMHC/100 nm², o de

5 aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² a aproximadamente 7 pMHC/100 nm², o de aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² a aproximadamente 6 pMHC/100 nm², o de aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² a aproximadamente 5 pMHC/100 nm², o de aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² a aproximadamente 4 pMHC/100 nm², o de

10 aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² a un aproximadamente 3 pMHC/100 nm², o de aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² a aproximadamente 2.5 pMHC/100 nm², o de aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² a aproximadamente 2 pMHC/100 nm², o de aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² a aproximadamente 1.5

15 pMHC/100 nm².

[0204] En otro aspecto más, la nanopartícula tiene una densidad de pMHC como se define aquí de aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² a aproximadamente 1.3 pMHC/100 nm², o

alternativamente de aproximadamente 0.5 pMHC/100 nm² a

20 aproximadamente 0.9 pMHC/100 nm², o alternativamente de aproximadamente 0.6 pMHC/100 nm² a aproximadamente 0.8 pMHC/100 nm², y además en el que el núcleo de nanopartículas tiene un diámetro de aproximadamente 25 nm a aproximadamente 60 nm, o de aproximadamente 25 nm a aproximadamente 50 nm, o

- de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 40 nm, o de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 50 nm, o de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 40 nm, o de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 35 nm, o de
- 5** aproximadamente 15 nm a aproximadamente 30 nm, o de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 25 nm, o alternativamente aproximadamente 15 nm, o aproximadamente 20 nm, o aproximadamente 25 nm, o aproximadamente 30 nm, o aproximadamente 35 nm, o aproximadamente 40 nm. En una
- 10** realización, la densidad de los complejos de pMHC por nanopartícula comprende aproximadamente 0.2 pMHC/100 nm² de área de superficie de la nanopartícula a aproximadamente 0.8 o 10 pMHC/100 nm² de área de superficie de la nanopartícula. En otro aspecto, la densidad de los complejos de pMHC por
- 15** nanopartícula es de aproximadamente 0.65 pMHC/100 nm² de área de superficie de la nanopartícula a aproximadamente 12 pMHC/100 nm² de área de superficie de la nanopartícula, así como rangos de densidad adicionales descritos aquí e incorporados aquí como referencia.
- 20** [0205] En algunos aspectos, la distancia intermolecular de los complejos de pMHC es de aproximadamente 4 nm a aproximadamente 300 nm, o alternativamente aproximadamente 10 nm a aproximadamente 250 nm, o alternativamente aproximadamente 10 nm a aproximadamente 200 nm, o

alternativamente aproximadamente 10 a aproximadamente 150 nm, o alternativamente aproximadamente 10 nm a aproximadamente 100 nm, o alternativamente aproximadamente 10 nm a aproximadamente 50 nm, o alternativamente aproximadamente 12 nm a aproximadamente 30 nm, o alternativamente aproximadamente 12 nm a aproximadamente 20 nm. En algunas realizaciones, la distancia intermolecular de los complejos de pMHC es de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 20 nm.

[0206] En algunos aspectos, en este documento se proporciona un complejo que comprende un núcleo de nanopartículas, en el que una pluralidad de complejos antígeno-MHC (pMHC) relevantes para la enfermedad están acoplados al núcleo; el diámetro del núcleo es de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 25 nm; y en el que la densidad de pMHC en la nanopartícula es de aproximadamente 0.4 pMHC/100 nm² a aproximadamente 6 pMHC/100 nm² del área superficial de la nanopartícula. En algunas realizaciones, el complejo comprende además una capa externa en el núcleo de nanopartículas, en donde el complejo pMHC está acoplado al núcleo de nanopartículas o la capa externa, y en donde el diámetro del núcleo de nanopartículas y la capa externa es de aproximadamente 35 nm a aproximadamente 75 nm, o alternativamente de aproximadamente 35 nm a aproximadamente 70 nm, o de aproximadamente 35 nm a aproximadamente 65 nm.

[0207] El término "operativamente acoplado" o "recubierto" como se usa en el presente documento, se refiere a una situación en la que los componentes individuales de polipéptido (por ejemplo, MHC) y antigénico (por ejemplo, Péptido) se combinan para formar el complejo activo antes de unirse al objetivo sitio, por ejemplo, una célula inmune. Esto incluye la situación en la que los componentes del complejo de polipéptidos individuales se sintetizan o se expresan recombinantemente y posteriormente se aíslan y combinan para formar un complejo, in vitro, antes de la administración a un sujeto; La situación en la que un polipéptido quimérico o de fusión (es decir, cada componente de proteína discreta del complejo está contenido en una sola cadena de polipéptidos) se sintetiza o se expresa de forma recombinante como un complejo intacto. Típicamente, los complejos de polipéptidos se agregan a las nanopartículas para producir nanopartículas con complejos de polipéptidos adsorbidos o acoplados que tienen una relación de número de moléculas: número de nanopartículas de aproximadamente, al menos aproximadamente o a lo sumo alrededor de 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 o más a:1, más típicamente 0.1:1, 1:1 a 50:1 o 300:1, y rangos allí donde

las proporciones proporcionan los puntos finales seleccionados de cada rango. El contenido de polipéptidos de las nanopartículas se puede determinar utilizando técnicas estándar.

5 El MHC Del Antígeno/MHC

[0208] Como se usa en el presente documento y, a menos que se indique específicamente, el término MHC en el contexto de un complejo pMHC pretende una proteína MHC clásica o no clásica de clase I o una proteína MHC clásica o no clásica de **10** clase II, cualquier loci de HLA DR, HLA DQ, HLA DP, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, CD1d, o un fragmento o equivalente biológico del mismo, construcciones de cadena doble o simple, dímeros (fusiones Fc), tetrámeros, multiméricos formas y una forma polimérica de MHCI o MHCII. En algunas realizaciones, **15** el pMHC puede ser una construcción de cadena única. En algunas realizaciones, el pMHC puede ser una construcción de doble cadena.

[0209] En algunas realizaciones, la proteína MHC puede ser un dímero o un multímero.

20 [0210] En algunas realizaciones, la proteína MHC puede comprender un heterodímero o multímero MHC-alfa-Fc/MHC-beta-Fc basado en "botón en el ojal".

[0211] Como se señaló anteriormente, "botón en el ojal" es una arquitectura de polipéptido que requiere una

protuberancia (o "botón") en una interfaz de un primer polipéptido y una cavidad correspondiente (o un "ojal") en una interfaz de un segundo polipéptido, de modo que la protuberancia se pueda colocar en la cavidad para promover la

5 formación de heteromultímero. Las protuberancias se construyen reemplazando pequeñas cadenas laterales de aminoácidos de la interfaz del primer polipéptido con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, fenilalanina o tirosina). Las cavidades de tamaño idéntico o similar a las

10 protuberancias se crean en la interfaz del segundo polipéptido reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Las protuberancias y cavidades se pueden hacer por medios sintéticos tales como alterando el ácido nucleico que

15 codifica los polipéptidos o por síntesis de péptidos, utilizando métodos de rutina para un experto en la materia. En algunas realizaciones, la interfaz del primer polipéptido está ubicada en un dominio Fc en el primer polipéptido; la interfaz del segundo polipéptido se encuentra en un dominio

20 Fc en el segundo polipéptido.

[0212] Como se indicó anteriormente, "MHC-alfa-Fc/MHC-beta-Fc" es un heterodímero que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en el que el primer polipéptido comprende una cadena α de MHC de clase II y un

dominio Fc de anticuerpo; el segundo polipéptido comprende una cadena β de MHC de clase II y un dominio Fc de anticuerpo. El botón en ojal MHC-alfa-Fc/MHC-beta-Fc requiere además que los dominios Fc de cada polipéptido interactúen
5 entre sí a través del posicionamiento complementario de una protuberancia en un dominio Fc dentro de la cavidad correspondiente en el otro dominio Fc.

[0213] En ciertas realizaciones de la divulgación, se identifica un antígeno particular y se presenta en el
10 complejo antígeno MHC de nanopartícula en el contexto de un polipéptido MHC de clase I o II apropiado. La presentación de antígenos a las células T está mediada por dos clases distintas de moléculas, MHC clase I (MHC-I) y MHC clase II (MHC-II), que utilizan distintas vías de procesamiento de
15 antígeno. Los péptidos derivados de antígenos intracelulares se presentan a las células T CD8+ por las moléculas MHC de clase I, que se expresan en prácticamente todas las células, mientras que los péptidos derivados de antígeno extracelular se presentan a las células T CD4+ por las moléculas MHC-II.
20 Sin embargo, hay ciertas excepciones a esta dicotomía. Varios estudios han demostrado que los péptidos generados a partir de partículas solubles o proteínas endocitosadas se presentan en las moléculas de MHC-I en los macrófagos y en las células dendríticas. En ciertos aspectos, la composición genética de

- un sujeto puede evaluarse para determinar qué polipéptido MHC se utilizará para un paciente particular y un conjunto particular de péptidos. En ciertas realizaciones, el componente de MHC de clase I puede comprender, consistir
- 5** esencialmente en, o alternativamente consistir en el mismo todo o parte de un HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G o Molécula CD-1. En realizaciones en las que el componente de MHC es un componente de MHC de clase II, el componente de MHC de clase II puede comprender, consistir esencialmente o,
- 10** alternativamente, consistir en todo o parte de un HLA-DR, HLA-DQ o HLA-DP. En ciertas realizaciones, el MHC puede comprender HLA DRB1, HLA DRB3, HLA DRB4, HLA DRB5, HLA DQB1, HLA DQA1, IAg7, I-Ab, I-Ad, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-A, HLA- B, HLA-C, HLA-E o CD1d.
- 15** [0214] Las moléculas de MHC no clásicas también se contemplan para su uso en complejos de MHC de la descripción. En algunas realizaciones, las moléculas de MHC no clásicas no son polimórficas, se conservan entre especies y poseen bolsas estrechas, profundas e hidrófobas que se unen a ligandos.
- 20** Estos bolsillos de unión son capaces de presentar glicolípidos y fosfolípidos a las células T Natural Killer (NKT). Las células NKT representan una población de linfocitos única que coexpresa marcadores de células NK y un receptor de células T semi invariable (TCR). Están implicados

en la regulación de las respuestas inmunes asociadas con una amplia gama de enfermedades.

[0215] Como se indicó anteriormente, el término "MHC" se puede usar indistintamente con el término "antígeno leucocitario humano" (HLA) cuando se usa en referencia al MHC humano; por lo tanto, MHC se refiere a todos los subtipos de HLA, incluidos, entre otros, los genes MHC clásicos descritos anteriormente: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR, además de todas las variantes, isoformas, isotipos y otros equivalentes biológicos de los mismos.

[0216] Los MHC para su uso de acuerdo con la presente divulgación pueden producirse, aislarse o purificarse mediante técnicas conocidas en la técnica. Los protocolos comunes para obtener MHC implican pasos que incluyen, entre otros, electroforesis u otras técnicas de carga o separación basada en tamaño, biotinilación u otros métodos de marcado y purificación, o transfección e inducción de construcciones de vectores que expresan proteínas MHC. Los anticuerpos animales purificados también están disponibles a través de fuentes disponibles comercialmente, incluidos minoristas como eBioscience, Biolegend y Tonbo Biosciences.

[0217] En ciertas realizaciones, el MHC de los complejos antígeno-MHC puede ser MHCI clásico, MHCI no clásico, MHCII clásico, MHCII no clásico, dímeros (fusiones de Fc),

tetrámeros MHC, multímeros o una forma polimérica de MHC. En algunas realizaciones, los multímeros de MHC se generan de acuerdo con métodos bien documentados en la técnica, véase, por ejemplo, Bakker et al. "MHC Multimer Technology: Current Status and Future Prospects", "Current Opinion in Immunology" 17 (4): 428-433 (2005) y referencias citadas en el mismo. Los métodos ejemplares no limitantes incluyen el uso de un agente biotinilante tal como estreptavidina o avidina para unir monómeros de MHC, creando una estructura multimérica con el agente como columna vertebral. Los dímeros de MHC, específicamente, pueden producirse alternativamente mediante fusión con regiones constantes de anticuerpos o regiones Fc; Esto se puede lograr mediante el acoplamiento operativo directamente o mediante un conector, por ejemplo, un conector de cisteína.

Los Antígenos del pMHC

[0218] Aunque en el presente documento se describen ejemplos específicos de antígenos y componentes antigénicos, la divulgación no es tan limitada. A menos que se indique específicamente lo contrario, se incluyen en el presente documento equivalentes de los antígenos de polipéptidos aislados o purificados que comprenden, o consisten esencialmente en, o además consisten en, las secuencias de aminoácidos como se describe en este documento, o un

polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia, o alternativamente al menos 85%, o alternativamente al menos 90%, o alternativamente al menos 95%, o alternativamente al menos 98% de identidad de

5 secuencia a las secuencias de aminoácidos de los antígenos, o polipéptidos codificados por polinucleótidos que tienen aproximadamente 80% de identidad de secuencia, o alternativamente al menos 85%, o alternativamente al menos 90%, o alternativamente al menos 95%, o alternativamente al

10 menos 98% de identidad de secuencia con el polinucleótido que codifica las secuencias de aminoácidos del antígeno, o su complemento, o un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibrida en condiciones de rigurosidad moderada a alta con un polinucleótido que codifica la

15 secuencia de aminoácidos de los antígenos, o su complemento. También se proporcionan polinucleótidos aislados y purificados que codifican los polipéptidos antigénicos descritos aquí, o aminoácidos que tienen al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con los mismos,

20 o alternativamente al menos 85%, o alternativamente al menos 90%, o alternativamente al menos 95%, o alternativamente al menos 98% de identidad de secuencia con las secuencias descritas, o un equivalente, o un polinucleótido que hibrida en condiciones estrictas con el polinucleótido, su

equivalente o su complemento, y polipéptidos aislados o purificados codificados por estos polinucleótidos. Los polipéptidos y polinucleótidos se pueden combinar con sustancias de origen no natural con las que no están asociados en la naturaleza, por ejemplo, portadores, portadores farmacéuticamente aceptables, vectores y moléculas de MHC. Además de los antígenos descritos en este documento, los antígenos descritos en el documento WO 2016/198932 del solicitante, incorporados aquí como referencia.

10 Péptidos Modificados Y Equivalentes A Los Mismos

[0219] Los polipéptidos, proteínas y fragmentos antigénicos de los mismos pueden modificarse mediante diversas deleciones, inserciones o sustituciones de aminoácidos. En realizaciones particulares, los polipéptidos o péptidos modificados son capaces de modular una respuesta inmune en un sujeto. Como se usa en el presente documento, una "proteína" o "polipéptido" o "péptido" se refiere a una molécula que comprende al menos cinco residuos de aminoácidos. En algunas realizaciones, se emplea una versión de tipo salvaje de una proteína o péptido; sin embargo, en muchas realizaciones de la divulgación, se emplea una proteína o polipéptido modificado para generar un complejo péptido/MHC/nanopartícula. Se puede usar un complejo péptido/MHC/nanopartícula para generar una respuesta inmune o

modificar la población celular T del sistema inmune (es decir, reeducar el sistema inmune). Los términos descritos anteriormente pueden usarse indistintamente en el presente documento. Una "proteína modificada" o "polipéptido modificado" o "péptido modificado" se refiere a una proteína o polipéptido cuya estructura química, particularmente su secuencia de aminoácidos, se altera con respecto a la proteína o polipéptido de tipo salvaje. En algunas realizaciones, una proteína o polipéptido o péptido modificado tiene al menos una actividad o función modificada (reconociendo que las proteínas o polipéptidos o péptidos pueden tener múltiples actividades o funciones). Se contempla específicamente que una proteína o polipéptido o péptido modificado puede alterarse con respecto a una actividad o función y aun así conservar una actividad o función de tipo salvaje en otros aspectos, como la inmunogenicidad o la capacidad de interactuar con otras células del sistema inmunitario cuando en el contexto de un complejo MHC/nanopartículas.

20 [0220] Las proteínas de la divulgación pueden ser recombinantes o sintetizadas in vitro. Alternativamente, una proteína recombinante puede aislarse de bacterias u otra célula huésped.

[0221] También se entenderá que las secuencias de

aminoácidos y ácidos nucleicos pueden incluir residuos adicionales, tales como aminoácidos N o C terminales adicionales o secuencias de ácido nucleico 5' o 3', respectivamente, y aún ser esencialmente como un conjunto en una de las secuencias descritas en el presente documento, siempre que la secuencia cumpla con los criterios establecidos anteriormente, incluido el mantenimiento de la actividad proteica biológica (por ejemplo, inmunogenicidad). La adición de secuencias terminales se aplica particularmente a secuencias de ácido nucleico que pueden, por ejemplo, incluir varias secuencias no codificantes que flanquean cualquiera de las porciones 5' o 3' de la región codificante.

Antígenos Relevantes Para La Enfermedad

[0222] Las nanopartículas son útiles en los métodos terapéuticos como se describen en el presente documento. El complejo pMHC del pMHC-NP se selecciona para su uso en función de la enfermedad a tratar. Por ejemplo, un antígeno relevante para la diabetes es un antígeno o fragmento del mismo que se expresa en la célula, tejido u órgano objetivo de esa enfermedad autoinmune, se expone al sistema inmunitario tras el daño celular, tisular u orgánico causado por la respuesta autoinmune, incluso si el antígeno no es el desencadenante del proceso de la enfermedad o un jugador clave en su patogénesis y, cuando se presenta, produce una

respuesta inmune que sirve para tratar la diabetes; por lo tanto, se selecciona un antígeno relevante para la diabetes que cumpla con esta definición para tratar la diabetes. Se selecciona un antígeno relevante para la EM para tratar la

5 EM. No se seleccionaría un antígeno relevante para la diabetes para tratar la EM. Los antígenos ejemplares no relevantes y relevantes para la enfermedad se describen en el presente documento y, además, dichos antígenos pueden determinarse para una enfermedad particular en base a

10 técnicas, mecanismos y métodos bien documentados en la literatura.

[0223] Los ejemplos no limitantes de enfermedades de interés incluyen, entre otros, asma, diabetes mellitus tipo I y tipo II, prediabetes, esclerosis múltiple, neuropatía

15 periférica, asma alérgica, cirrosis biliar primaria, cirrosis, neuromielitis óptica. trastorno del espectro, síndromes neurológicos asociados a autoanticuerpos como síndrome de persona rígida, encefalitis autoinmune, narcolepsia, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, psoriasis,

20 enfermedad/síndrome de Sjögren, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), artritis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (lupus eritematoso sistémico), esclerodermia, vasculitis asociada a ANCA, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Kawasaki, enfermedad celíaca,

miocardiopatía autoinmune, miocardiopatía dilatada idiopática (IDCM), miastenia Graves, uveítis autoinmune, espondilitis anquilosante, enfermedad de Graves, síndrome de miopatía inmunitaria ANCA+), aterosclerosis, hepatitis autoinmune, colangitis esclerosante, colangitis esclerosante primaria, dermatomiositis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, lesión de la médula espinal, lesión traumática, destrucción pulmonar inducida por el tabaco, enfisema, pénfigo, uveítis, cualquier otro cáncer relevante o enfermedades del sistema nervioso central y periférico.

[0224] Los antígenos o componentes antigénicos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la Solicitud de Estados Unidos No. 15/348,959, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

15 Antígenos Relevantes Para La Diabetes

[0225] Los antígenos relevantes para la diabetes incluyen, entre otros, los derivados de PPI, IGRP, GAD, autoantígeno-2 de células de los islotes (ICA2) o insulina. Los péptidos antigénicos autorreactivos relevantes para la diabetes incluyen, pero no se limitan a, hInsB₁₀₋₁₈ (HLVEALYLV), hIGRP₂₂₈₋₂₃₆ (LNIDLLWSV), hIGRP₂₆₅₋₂₇₃ (VLFGLGFAI), IGRP₂₀₆₋₂₁₄ (VYLKTNVFL), hIGRP₂₀₆₋₂₁₄ (VYLKTNLFL), NRP-A7 (KYNKANAFI), NRP-I4 (KYNIANVFL), NRP-V7 (KYNKANVFL), YAI/D^b (FQDENYLYL) INS B₁₅₋₂₃ (LYLVCGERG), PPI₇₆₋₉₀ (K88S) (SLQPLALEGSLQSRG), IGRP₁₃₋₂₅

(QHLQKDYRAYYTF), GAD₅₅₅₋₅₆₇ (NFFRMVISNPAAT), GAD₅₅₅₋₅₆₇ (557I):
 (NFIRMVISNPAAT), IGRP₂₃₋₃₅ (YTFLNFMSNVGDP), B₂₄-C₃₆
 (FFYTPKTRREAED), PPI₇₆₋₉₀ (SLQPLALEGSLQKRG), así como los
 péptidos y proteínas descritos en la Publicación de Estados
 5 Unidos 2005/0202032, que se incorpora aquí como referencia en
 su totalidad. Otros péptidos que pueden usarse junto con esta
 descripción como péptidos autorreactivos o como péptidos de
 control incluyen, pero no se limitan a, INS-I9 (LYLVCGERI),
 TUM (KYQAVTTTL), y G6Pase (KYCLITIFL), así como equivalentes
 10 de cada uno de ellos. Ejemplos adicionales incluyen Pro-
 insulina_{L2-10}, ALWMRLLPL; Pro-insulina_{L3-11}, LWMRLLPLL; Pro-
 insulina_{L6-14}, RLLPLLALL; Pro-insulina_{B5-14}, HLCGSHLVEA; Pro-
 insulina_{B10-18}, HLVEALYLV; Pro-insulina_{B14-22}, ALYLVCGER; Pro-
 insulina_{B15-24}, LYLVCGERGF; Pro-insulina_{B17-25}, LVCGERGFF; Pro-
 15 insulina_{B18-27}, VCGERGFFYT; Pro-insulina_{B20-27}, GERGFFYT; Pro-
 insulina_{B21-29}, ERGFFYTPK; Pro-insulina_{B25-C1}, FYTPKTRRE; Pro-
 insulina_{B27-C5}, TPKTRREAEDL; Pro-insulina_{C20-28}, SLQPLALEG; Pro-
 insulina_{C25-33}, ALEGLQKR; Pro-insulina_{C29-A5}, SLQKRGIVEQ; Pro-
 insulina_{A1-10}, GIVEQCCTSI; Pro-insulina_{A2-10}, IVEQCCTSI; Pro-
 20 insulina_{A12-20}, SLYQLENYC o equivalentes o combinaciones de los
 mismos. Los antígenos relevantes para la diabetes incluyen,
 entre otros, los enumerados en la Tabla 1, así como sus
 equivalentes y combinaciones de los mismos.

Antígenos Relevantes Para La EM

[0226] Los antígenos de la descripción incluyen antígenos relacionados con la esclerosis múltiple. Dichos antígenos incluyen, por ejemplo, los divulgados en la publicación de
5 solicitud de patente de EE. UU. N ° 2012/0077686, y antígenos derivados de la proteína básica de mielina, glicoproteína asociada a mielina, proteína de oligodendrocitos de mielina, proteína de proteolípidos, oligoproteína de mielina de oligodendrocitos, proteína básica de oligodendrocitos de
10 mielina, oligodendrocitos proteína específica, proteínas de choque térmico, proteínas específicas de oligodendrocitos NOGO A, glicoproteína Po, proteína de mielina periférica 22 y nucleótido 2'3'-cíclico 3'-fosfodiesterasa. En ciertas realizaciones, el antígeno se deriva de la glicoproteína
15 oligodendrocítica de mielina (MOG).

[0227] En otros aspectos, los antígenos peptídicos para el tratamiento de la EM y los trastornos relacionados con la EM incluyen, sin limitación: MOG₃₅₋₅₅, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; MOG₃₆₋₅₅, EVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; MAG₂₈₇₋₂₉₅, SLLLELEEV; MAG₅₀₉₋₅₁₇,
20 LMWAKIGPV; MAG₅₅₆₋₅₆₄, VLFSSDFRI; MBP₁₁₀₋₁₁₈, SLSRFSWGA; MOG₁₁₄₋₁₂₂, KVEDPFYWV; MOG₁₆₆₋₁₇₅, RTFDPHFLRV; MOG₁₇₂₋₁₈₀, FLRVPCWKI; MOG₁₇₉₋₁₈₈, KITLFVIVPV; MOG₁₈₈₋₁₉₆, VLGPLVALI; MOG₁₈₁₋₁₈₉, TLFVIVPVL; MOG₂₀₅₋₂₁₄, RLAGQFLEEL; PLP₈₀₋₈₈, FLYGALLLA MAG₂₈₇₋₂₉₅, SLLLELEEV; MAG₅₀₉₋₅₁₇, LMWAKIGPV; MAG₅₅₆₋₅₆₄, VLFSSDFRI, MOG₉₇₋₁₀₉

(TCFFRDHSYQEEA), MOG₉₇₋₁₀₉ (E107S) (TCFFRDHSYQSEA), MBP₈₉₋₁₀₁ (VHFFKNIVTPRTP), PLP₁₇₅₋₁₉₂ (YIYFNTWTTTCQSIAFPSK), PLP₉₄₋₁₀₈ (GAVRQIFGDYKTTIC, MBP₈₆₋₉₈ (PVVHFFKNIVTPR - HLA-DRB1*1501 (13mer péptido), PLP₅₄₋₆₈ (NYQDYEYLINVIHAF), PLP₂₄₉₋₂₆₃ (ATLVSLTTFMIAATY), MOG₁₅₆₋₁₇₀ (LVLLAVLPVLLLQIT), MOG₂₀₁₋₂₁₅ (FLRVPCWKITLFVIV), y equivalentes o combinaciones de los mismos. Los antígenos relevantes para la esclerosis múltiple incluyen, entre otros, los enumerados en la Tabla 1, así como sus equivalentes y combinaciones de los mismos.

10 **Antígenos Relevantes Para La Enfermedad Celíaca (EC)**

[0228] Los antígenos relevantes para la enfermedad celíaca incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de aGlia. Los antígenos no limitantes relevantes para la enfermedad celíaca incluyen gliadina. Otros antígenos ejemplares no limitantes relevantes para la enfermedad celíaca incluyen:

15 aGlia₅₇₋₆₈: QLQPFQPELPY (12mer péptido); aGlia₆₂₋₇₂: PQPELPYPQPE (11mer péptido); aGlia₂₁₇₋₂₁₉; y SGEFSFQPSQQNP (13mer péptido), equivalentes y combinaciones de los mismos. Los antígenos relevantes para la enfermedad de apio incluyen,

20 entre otros, los enumerados en la tabla 1, así como sus equivalentes y combinaciones de los mismos.

Antígenos Relevantes De Cirrosis Biliar Primaria (PBC)

[0229] Los antígenos relevantes para la cirrosis biliar primaria incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados

de PDC-E2. Los ejemplos no limitantes de antígenos ejemplares incluyen: PDC-E2₁₂₂₋₁₃₅: GDLIAEVETDKATV (14mer péptido); PDC-E2₂₄₉₋₂₆₂: GDLLAEIETDKATI (14mer péptido); PDC-E2₂₄₉₋₂₆₃: GDLLAEIETDKATIG (15mer péptido); and PDC-E2₆₂₉₋₆₄₃:

- 5 AQLAEFRKYLEKPI (15mer péptido), equivalentes y combinaciones de los mismos. Los antígenos relevantes para la cirrosis biliar primaria incluyen, entre otros, los enumerados en la Tabla 1, así como sus equivalentes y combinaciones de los mismos.

10 **Antígenos Relevantes De Pénfigo Follicular (PF) Y Pénfigo Vulgar (PV)**

[0230] Los antígenos relevantes para PF y PV incluyen, entre otros, los derivados de DG1EC2, desmogleína 3, (DG3 o DSG3) o desmogleína 1 (DG1 o DSG1). Los ejemplos no limitantes

- 15 incluyen: DG1EC2₂₁₆₋₂₃₅: GEIRTMNNFLDREI (14mer péptido); DG3₉₇₋₁₁₁: FGIFVVDKNTGDINI (15mer péptido); y DG3₂₅₁₋₂₆₅: CECNIKVKDVNDNFP (15mer péptido), equivalentes y combinaciones de los mismos. Los antígenos relevantes para Pénfigo foliáceo y Pénfigo vulgar incluyen, pero no se limitan a, los que
- 20 figuran en la Tabla 1, así como sus equivalentes y combinaciones de los mismos.

Antígenos Relevantes de Neuromielitis Óptica (NMO)

[0231] Los antígenos relevantes para NMO incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de AQP4 o aquaporina 4. Los

- ejemplos no limitantes incluyen: AQP4₁₂₉₋₁₄₃: GAGILYLVTPPSVVG (15mer péptido); AQP4₂₈₄₋₂₉₈: RSQVETDDLILKPGV (15mer péptido); AQP4₆₃₋₇₆: EKPLPVDMVLISLC (14mer péptido); AQP4₁₂₉₋₁₄₃: GAGILYLVTPPSVVG (15mer péptido); y AQP4₃₉₋₅₃: TAEFLAMLIFVLLSL (15mer péptido), equivalentes y combinaciones de los mismos.
- Los antígenos relevantes para NMO incluyen, pero no se limitan a, los enumerados en la Tabla 1, así como sus equivalentes y combinaciones de los mismos.

Artritis Inducida Por Colágeno Antígenos Relevantes

- 10 [0232] Los antígenos relevantes para la artritis inducida por colágeno incluyen, pero sin limitación, los derivados de CII. Los ejemplos no limitantes incluyen: cCII₂₃₀₋₂₄₄: APGFPGPRGPPGPQG (15mer péptido); cCII₆₃₂₋₆₄₆: PAGFAGPPGADGQPG (15mer péptido); y CII₂₅₉₋₂₇₃: GIAGFKGDQGPGET (15mer péptido),
- 15 o equivalentes y combinaciones de los mismos. Los antígenos relevantes para la artritis incluyen, entre otros, los enumerados en la Tabla 1, así como sus equivalentes y combinaciones de los mismos.

Asma Alérgica Antígenos Relevantes

- 20 [0233] Los antígenos relevantes para el asma alérgico incluyen, pero no se limitan a, los derivados de DERP1 y DERP2. Los antígenos relevantes para el asma alérgico incluyen, entre otros, los enumerados en la Tabla 1, así como sus equivalentes y combinaciones de los mismos.

Antígenos Relevantes Para Colitis

[0234] Los antígenos relevantes para la colitis experimental incluyen, pero no se limitan a, los derivados de bacteroides integrasa, Fla-2/Fla-X e YIDX. Los antígenos relevantes para la colitis incluyen, entre otros, los enumerados en la Tabla 1, así como sus equivalentes y combinaciones de los mismos.

Antígenos Relevantes De Lupus Eritematoso Sistémico (LES)

[0235] Los antígenos relevantes para SLE incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de H4, H2B, H1', ADNds, RNP, Smith (Sm), SSA/Ro, SSB/La (SS-B), o histonas. Los ejemplos no limitantes incluyen los siguientes segmentos de cada proteína:

H4₇₁₋₉₄: TYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQG, H4₇₄₋₈₈: EHAKRKTVTAMDVVY (15mer péptido); H4₇₆₋₉₀: AKRKTVTAMDVVYAL (15mer péptido); H4₇₅₋₈₉: HAKRKTVTAMDVVYA (15mer péptido); H4₇₈₋₉₂: RKTAMDVVYALKR (15mer péptido); H4₈₀₋₉₄: TVTAMDVVYALKRQ (15mer péptido); H2B₁₀₋₂₄: PKKGSKKAVTKAQKK (15mer péptido); and H2B₁₆₋₃₀: KAVTKAQKKDGKKRK (15mer péptido), H1'₂₂₋₄₂: STDHPKYSDMIVAAIQAEKNR; y H1'₂₇₋₄₁: KYSDMIVAAIQAEKN, así como equivalentes y combinaciones de los mismos. Los LES relevantes para los antígenos incluyen, pero no se limitan a los enumerados en la Tabla 1, así como sus equivalentes y combinaciones de los mismos.

Antígenos Relevantes Para La Aterosclerosis Inducida Por Una Dieta Alta En Grasas

[0236] Los antígenos relevantes para la aterosclerosis inducida por una dieta alta en grasas incluyen, entre otros, los derivados de ApoB. Los ejemplos no limitantes incluyen los siguientes segmentos de cada proteína: ApoB₃₅₀₁₋₃₅₁₆: SQEYSGSVANEANVY (15mer péptido); ApoB₁₉₅₂₋₁₉₆₆: SHSLPYESSISTALE (15mer péptido); ApoB₉₇₈₋₉₉₃: TGAYSNASSTESASY (15mer péptido); ApoB₃₄₉₈₋₃₅₁₃: SFLSQEYSGSVANEA (15mer péptido); ApoB_{210A}: KTTKQSFDSL SVKAQYKKNKH (20mer péptido); ApoB_{210B}: KTTKQSFDSL SVKAQY (15mer péptido); y ApoB_{210C}: TTKQSFDSL SVKAQYK (péptido 15mer) así como equivalentes y combinaciones de los mismos. Los antígenos relevantes para la aterosclerosis incluyen, entre otros, los enumerados en la Tabla 1, así como sus equivalentes y combinaciones de los mismos.

Antígenos Relevantes De EPOC Y Enfisema

[0237] Los antígenos relevantes para la EPOC o el enfisema incluyen, entre otros, los derivados de la elastina. Los ejemplos no limitantes incluyen los siguientes segmentos de elastina. Los antígenos relevantes para la EPOC o el enfisema incluyen, entre otros, los enumerados en la Tabla 1, así como sus equivalentes y combinaciones de los mismos.

Antígenos Relevantes Para La Psoriasis

[0238] Los antígenos relevantes para la psoriasis incluyen,

pero no se limitan a los enumerados en la Tabla 1, así como equivalentes y combinaciones de los mismos. Otros antígenos ejemplares no limitantes relevantes para la psoriasis incluyen la proteína 5 de tipo adamis humano (ATL5), el

5 péptido antimicrobiano de catelicidina (CAP18) o la proteína 5 de tipo ADAMTS (ADMTSL5).

Antígenos Relevantes para la Hepatitis Autoinmune

[0239] Los antígenos relevantes para la hepatitis autoinmune incluyen, pero no se limitan a los descritos en la Tabla 1,

10 así como equivalentes y combinaciones de los mismos. Otros antígenos autoinmunes ejemplares no limitantes relevantes para la hepatitis incluyen el citocromo P450 2D6 (CYP2D6) o el antígeno soluble del hígado (SLA).

Antígenos Relevantes para la Uveítis

15 [0240] Los antígenos relevantes para la uveítis incluyen, pero no se limitan a los descritos en la Tabla 1, así como equivalentes y combinaciones de los mismos. Otros antígenos ejemplares no limitantes relevantes para la uveítis incluyen arrestina, S-arrestina, antígeno S retiniano humano o

20 proteína de unión a un interfotorreceptor retinoide (IRBP).

Antígenos Relevantes Para El Síndrome De Sjögren

[0241] Los antígenos relevantes para el Síndrome de Sjögren incluyen, pero no se limitan a los descritos en la Tabla 1, así como equivalentes y combinaciones de los mismos. Otros

antígenos ejemplares no limitativos relevantes para el Síndrome de Sjögren incluyen SSA/Ro (TROVE), SSB/La, o el receptor muscarínico 3 (MR3).

Antígenos Relevantes para la Esclerodermia

- 5 [0242] Los antígenos relevantes para la esclerodermia incluyen, pero no se limitan a, proteína de centrómero autoantígeno centromérico C (CENP-C), ADN topoisomerasa I (TOP1) o ARN polimerasa III.

Antígenos Relevantes para el Síndrome Antifosfolípido

- 10 [0243] Los antígenos relevantes para el síndrome antifosfolípido incluyen, pero sin limitación, los descritos en la Tabla 1, así como equivalentes y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de antígenos relevantes para el síndrome antifosfolípido no limitativo incluyen beta-2-glucoproteína 1
- 15 (BG2P1 o APOH).

Antígenos Relevantes para la Vasculitis Asociados A ANCA

- [0244] Los antígenos relevantes para vasculitis asociados a ANCA incluyen, pero no se limitan a los descritos en la Tabla 1, así como equivalentes y combinaciones de los mismos. Los
- 20 ejemplos de antígenos relevantes para vasculitis asociados a ANCA no limitantes incluyen mieloperoxidasa (MPO), proteinasa (PR3) o factor de aumento de la permeabilidad bacteriana (BPI).

Tabla 1 - Antígenos Relacionados Con La Enfermedad

Antígeno de la Enfermedad	Péptidos Antigénicos	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
Antígenos relevantes para la artritis inducida por colágeno.	cCII (230-244)	APGFPGPRGPPGPQG	1
	cCII (632-646)	PAGFAGPPGADGQPG	2
	CII (259-273)	GIAGFKGDQGPKGET	3
Péptidos Antigénicos Relevantes para la Diabetes	hInsB (10-18)	HLVEALYLV	4
	hIGRP (228-236)	LNIDLLWSV	5
	hIGRP (265-273)	VLFGLGFAI	6
	hIGRP (206-214)	VYLKTNLFL	7
	IGRP (206-214)	VYLKTNVFL	8
	IGRP (13-25)	QHLQKDYRAYYTF	9
	IGRP (23-35)	YTFLNFMSNVGDP	10
	NRP-A7	KYNKANAFLL	11
	NRP-I4	KYNIANVFL	12
	NRP-V7	KYNKANVFL	13
	YAI/D ^b	FQDENYLYL	14
	INS B (15-23)	LYLVCGERG	15
	INS-I9	LYLVCGERI	16
	PPI (76-90)	SLQPLALEGSLQKRG	17
	PPI (76-90) (88S)	SLQPLALEGSLQSRG	18
	GAD (555-567)	NFFRMVISNPAAT	19
	GAD (555-567) (557I)	NFIRMVISNPAAT	20
	Pro-insulina (B24-C36)	FFYTPKTRREAED	21
	TUM	KYQAVTTTL	22
	G6Pase	KYCLITIFL	23
	Pro-insulina (L2-10)	ALWMRLPL	24
	Pro-insulina (L3-11)	LWMRLPL	25
	Pro-insulina (L6-14)	RLLPLLALL	26
	Pro-insulina (B5-14)	HLCGSHLVEA	27
	Pro-insulina (B10-18)	HLVEALYLV	28
	Pro-insulina (B14-	ALYLVCGER	29

	22)		
	Pro-insulina (B15-24)	LYLVCGGERGF	30
	Pro-insulina (B17-25)	LVCGERGFF	31
	Pro-insulina (B18-27)	VCGERGFFYT	32
	Pro-insulina (B20-27)	GERGFFYT	33
	Pro-insulina (B21-29)	ERGFFYTPK	34
	Pro-insulina (B25-C1)	FYTPKTRRE	35
	Pro-insulina (B27-C5)	TPKTRREAEDL	36
	Pro-insulina (C20-28)	SLQPLALEG	37
	Pro-insulina (C25-33)	ALEGLQKR	38
	Pro-insulina (C29-A5)	SLQKRGIVEQ	39
	Pro-insulina (A1-10)	GIVEQCCTSI	40
	Pro-insulina (A2-10)	IVEQCCTSI	41
	Pro-insulina (A12-20)	SLYQLENYC	42
Antígenos Relacionados con la Esclerosis Múltiple	MOG (35-55)	MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK	43
	MOG (6-20)	IGPRHPIRALVGDEV	44
	MOG (36-55)	EVGWYRSPFSRVVHLYRNGK	45
	MOG (114-122)	KVEDPFYWV	46
	MOG (166-175)	RTFDPHFRLV	47
	MOG (172-180)	FLRVPCWKI	48
	MOG (179-188)	KITLFVIVPV	49
	MOG (188-196)	VLGPLVALI	50
	MOG (181-189)	TLFVIVPVL	51
	MOG (205-214)	RLAGQFLEEL	52
	MOG (97-109)	TCFFRDHSYQEEA	53
	MOG (97-109) (E107S)	TCFFRDHSYQSEA	54
	MOG (223-237)	ALIICYNWLHRRLAG	55
	MOG (156-170)	LVLAVLPVLLQIT	56
	MOG (201-215)	FLRVPCWKITLFVIV	57
	MOG (38-52)	RHPIRALVGDEVELP	58
	MOG (203-217)	RVPCWKITLFVIVPV	59

	MAG (287-295)	SLLLEEEV	60
	MAG (509-517)	LMWAKIGPV	61
	MAG (556-564)	VLFSSDFRI	62
	MAG (509-517)	LMWAKIGPV	63
	MAG (556-564)	VLFSSDFRI	64
	MBP (110-118)	SLSRFSWGA	65
	MBP (13-32)	KYLATASTMDHARHGFLPRH	66
	MBP (83-99)	ENPVVHFFKNIVTPRTP	67
	MBP (111-129)	LSRFSWGAEGQRPFGYGG	68
	MBP (146-170)	AQGTLSKIFKLGGRDSRSGSPMAR R	69
	MBP (85-97)	NPVVHFFKNIVTP	70
	MBP (89-101)	VHFFKNIVTPRTP	71
	MBP (86-98)	PVVHFFKNIVTPR	72
	PLP (175-192)	YIYFNTWTTCQSIAPFSK	73
	PLP (94-108)	GAVRQIFGDYKTTIC	74
	PLP (54-68)	NYQDYEYLINVIHAF	75
	PLP (80-88)	FLYGALLLA	76
	PLP (249-263)	ATLVSLLTFMIAATY	77
	PLP (250-264)	TLVSLLTFMIAATYN	78
	PLP (88-102)	AEGFYTTGAVRQIFG	79
	PLP (139-154)	HCLGKWLGHDPKFVGI	80
*MBP Secuencias for MBP Isoform 6			
Antígenos Relevantes para la Enfermedad Celiaca (EC)	aGlia (57-68)	QLQPFPPQPELPY	81
	aGlia (62-72)	PQPELPYPQPE	82
	aGlia (217-229)	SGEGSFQPSQQNP	83
Antígenos relevantes de cirrosis biliar primaria (PBC)	PDC-E2 (122-135)	GDLIAEVETDKATV	84
	PDC-E2 (249-262)	GDLLAEIETDKATI	85
	PDC-E2 (249-263)	GDLLAEIETDKATIG	86
	PDC-E2 (629-643)	AQWLAEFRKYLEKPI	87
	PDC-E2 (72-86)	RLLLQLLGSPGRRYY	88
	PDC-E2 (353-367)	GRVFSPLAKKLAVE	89
	PDC-E2 (422-436)	DIPISNIRRVIAQRL	90
	PDC-E2 (629-643)	AQWLAEFRKYLEKPI	91
	PDC-E2 (80-94)	SPGRRYYSLPPHQKV	92
	PDC-E2 (353-367)	GRVFSPLAKKLAVE	93
	PDC-E2 (535-549)	ETIANDVVS LATKAR	94

Antígenos Relevantes para el Pénfigo Foliáceo (PF) y del pénfigo vulgar (PV)	DSG1 (216-229)	GEIRTMNNFLDREQ	95
	DSG1 (216-229; 229I)	GEIRTMNNFLDREI	96
	DSG1 (48-62)	KREWIKFAAACREGE	97
	DSG1 (206-222)	MFIINRNTGEIRTMN	98
	DSG1 (363-377)	SQYKLKASAI SVTVL	99
	DSG1 (3-17)	WSFFRVVAMLFIFLV	100
	DSG1 (192-206)	SKIAFKIIRQEPSDS	101
	DSG1 (326-340)	TNVGILKVVKPLDYE	102
	DSG1 (1-15)	MDWSFFRVVAMLFIF	103
	DSG1 (35-49)	KNGTIKWH SIRRQKR	104
	DSG1 (325-339)	RTNVGILKVVKPLDY	105
	DSG3 (97-111)	FGIFVVDKNTGDINI	106
	DSG3 (251-265)	CECNIKVKDVNDNFP	107
	DSG3 (351-365)	NKAEFHQSVISRYRV	108
	DSG3 (453-467)	DSTFIVNKTITAEVL	109
	DSG3 (540-554)	SITTLNATSALLRAQ	110
	DSG3 (280-294)	ILSSELLRFQVTDLD	111
	DSG3 (326-340)	EGILKVVKALDYEQL	112
	DSG3 (367-381)	STPVTIQVINVREGI	113
	DSG3 (13-27)	AIFVVVILVHGELRI	114
	DSG3 (323-337)	RTNEGILKVVKALDY	115
	DSG3438-452)	DSKTAEIKFVKNMNR	116
Antígenos relevantes para el trastorno del espectro de neuromielitis óptica (NMO)	AQP4 (129-143)	GAGILYLVTPPSVVG	117
	AQP4 (284-298)	RSQVETDDLILKPGV	118
	AQP4 (63-76)	EKPLPVDMVLISLC	119
	AQP4 (129-143)	GAGILYLVTPPSVVG	120
	AQP4 (39-53)	TAEFLAMLIFVLLSL	121
Antígenos relevantes para el asma alérgica	DERP-1 (16-30)	LRQMRTVTPIRMQGG	122
	DERP-1 (171-185)	AVNIVGY SNAQGV DY	123
	DERP-1 (110-124)	RFGISNYCQIYPPNV	124
	DERP-2 (26-40)	PCIIHRGKPFQLEAV	125
	DERP-2 (107-121)	TVKVMGDDGVLACAI	126
Antígenos relevantes de enfermedad inflamatoria intestinal o	bacteroides integrase antígeno (183-197)	EAINQGYMHADAYPF	127
	bacteroides integrase	KDLTYTFLRDFEQYL	128

colitis	antígeno (146-160)		
	bacteroides integrase antígeno (175-189)	RQLRTLVEAINQGY	129
	bacteroides integrase antígeno (1-15)	MDKIRYRLVYNRQNT	130
	bacteroides integrase antígeno (30-44)	LNQRKIYLNKTNVYLK	131
	bacteroides integrase antígeno (70-84)	EYILYLQGIELGYWK	132
	bacteroides integrase antígeno (337-351)	TCATLLIHQGVAITT	133
	bacteroides integrase antígeno (171-185)	AKHMRQLRTLVEAI	134
	bacteroides integrase antígeno (4-18)	IRYRLVYNRQNTLNR	135
	bacteroides integrase antígeno (256-270)	ENFIRINGKRWLYFK	136
	Fla-2/Fla-X (366-380)	TGAAATYAIIDSIADA	137
	Fla-2/Fla-X (164-178)	NATFSMDQLKFGDTI	138
	Fla-2/Fla-X (261-275)	DRTVVSSIGAYKLIQ	139
	Fla-2/Fla-X (1-15)	MVVQHNL RAMNSNRM	140
	Fla-2/Fla-X (51-65)	KMRKQIRGLSQASLN	141
	Fla-2/Fla-X (269-283)	GAYKLIQKELGLASS	142
	Fla-2/Fla-X (4-18)	QHNL RAMNSNRMLGI	143
	Fla-2/Fla-X (271-285)	YKLIQKELGLASSIG	144
	YIDX (93-107)	HNIQVADDARFVLNA	145
	YIDX (98-112)	ADDARFVLNAGKKKF	146
	YIDX (23-37)	GCISYALVSHTAKGS	147
	YIDX (78-92)	ADDIVKMLNDPALNR	148
	YIDX (195-209)	LPVTVTLDIITAPLQ	149
	YIDX (22-36)	SGCISYALVSHTAKG	150
	YIDX (80-94)	DIVKMLNDPALNRHN	151
	YIDX (101-115)	ARFVLNAGKKKFTGT	152

Antígenos relevantes para el Lupus eritematoso sistémico (LES)	H4 (71-94)	TYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQG	153
	H4 (74-88)	EHAKRKTVTAMDVVY	154
	H4 (76-90)	AKRKTVTAMDVVYAL	155
	H4 (75-89)	HAKRKTVTAMDVVYA	156
	H4 (78-92)	RKTVTAMDVVYALKR	157
	H4 (80-94)	TVTAMDVVYALKRQ	158
	H2B (10-24)	PKKGSKKAVTKAQKK	159
	H2B (16-30)	KAVTKAQKKDGKKRK	160
	H1' (22-42)	STDHPKYSDMIVAAIQAEKNR	161
	H1' (27-41)	KYSMDIVAAIQAEKN	162
Antígenos relevantes para la aterosclerosis	ApoB (3501-3516)	SQEYSGSVANEANVY	163
	ApoB (1952-1966)	SHSLPYESSISTALE	164
	ApoB (978-993)	TGAYSNASSTESASY	165
	ApoB (3498-3513)	SFLSQEYSGSVANEA	166
	ApoB (210A)	KTTKQSFDSL SVKAQYKKNKH	167
	ApoB (210B)	KTTKQSFDSL SVKAQY	168
	ApoB (210C)	TTKQSFDSL SVKAQYK	169
Antígenos relevantes para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o enfisema	ELN (89-103)	GALVPGGVADAAAAY	170
	ELN (698-712)	AAQFGLVGAAGLGGL	171
	ELN (8-22)	APRPGVLLLLLSILH	172
	ELN (94-108)	GGVADAAAAYKAAKA	173
	ELN (13-27)	VLLLLLSILHPSRPG	174
	ELN (695-709)	AAKAAQFGLVGAAGL	175
	ELN (563-577)	VAAKAQLRAAAGLGA	176
	ELN (558-572)	KSAAKVAQAQLRAA	177
	ELN (698-712)	AAQFGLVGAAGLGGL	178
	ELN (566-580)	KAQLRAAAGLGAGIP	179
	ELN (645-659)	VPGALAAAKAAYGA	180
Antígenos relevantes para la psoriasis	CAP18 (64-78)	RPTMDGDPDTPKPV	181
	CAP18 (34-48)	SYKEAVLRAIDGINQ	182
	CAP18 (47-61)	NQRSSDANLYRLLDL	183
	CAP18 (151-165)	KRIVQRIKDFLRNLV	184
	CAP18 (149-163)	EFKRIVQRIKDFLRN	185
	CAP18 (152-166)	RIVQRIKDFLRNLVP	186
	CAP18 (131-145)	RFALLGDFFRKSKEK	187
	CAP18 (24-38)	QRIKDFLRNLVPRTE	188
	ADAMTSL5 (245-259)	DGRYVLNGHWVVSPP	189

	ADAMTSL5 (267-281)	THVVYTRDTGPQETL	190
	ADAMTSL5 (372-386)	RLLHYCGSDFVFQAR	191
	ADAMTSL5 (289-303)	HDLLLQVLLQEPNPG	192
	ADAMTSL5 (396-410)	ETRYEVRIQLVYKNR	193
	ADAMTSL5 (433-447)	HRDYLMVQRLVSPD	194
	ADAMTSL5 (142-156)	EGHAFYHSFGRVLDG	195
	ADAMTSL5 (236-250)	RNHLALMGGDGRYVL	196
	ADAMTSL5 (301-315)	NPGIEFEFWLPRERY	197
	ADAMTSL5 (203-217)	VQRVFRDAGAFAGYW	198
	ADAMTSL5 (404-418)	QLVYKNRSPLRAREY	199
Antígenos relevantes para la hepatitis autoinmune	CYP2D6 (193-207)	RRFEYDDPRFLRLLD	200
	CYP2D6 (76-90)	TPVVVLNGLAAVREA	201
	CYP2D6 (293-307)	ENLRIVVADLFSAGM	202
	CYP2D6 (313-332)	TLAWGLLLMILHPDVQRRVQ	203
	CYP2D6 (393-412)	TTLITNLSSVLKDEAVWEKP	204
	CYP2D6 (199-213)	DPRFLRLLDLAQEG	205
	CYP2D6 (450-464)	RMELFLFFTSLLQHF	206
	CYP2D6 (301-315)	DLFSAGMVTSTTLA	207
	CYP2D6 (452-466)	ELFLFFTSLLQHFSF	208
	CYP2D6 (59-73)	DQLRRRFGDVFSLQL	209
	CYP2D6 (130-144)	EQRRFSVSTLRNLGL	210
	CYP2D6 (193-212)	RRFEYDDPRFLRLLDLAQEG	211
	CYP2D6 (305-324)	AGMVTSTTTLAWGLLLMILH	212
	CYP2D6 (305-325)	AGMVTSTTTLAWGLLLMILHP	213
	CYP2D6 (131-145)	QRRFSVSTLRNLGLG	214
	CYP2D6 (216-230)	ESGFLREVLNAVPL	215
	CYP2D6 (238-252)	GKVLRFQKAFLTQLD	216
	CYP2D6 (199-213)	DPRFLRLLDLAQEG	217
	CYP2D6 (235-252)	GKVLRFQKAFLTQLD	218
	CYP2D6 (293-307)	ENLRIVVADLFSAGM	219
	CYP2D6 (381-395)	DIEVQGFRIPKGTTL	220
	CYP2D6 (429-443)	KPEAFLPFSAGRRAC	221
	SLA (334-348)	YKKLLKERKEMFSYL	222
	SLA (196-210)	DELRTDLKAVEAKVQ	223
	SLA (115-129)	NKITNSLVLDIIKLA	224
	SLA (373-386)	NRLDRCLKAVRKER	225
	SLA (186-197)	LIQQGARVGRID	226
	SLA (317-331)	SPSLDVLITLLSLGS	227
	SLA (171-185)	DQKSCFKSMITAGFE	228

	SLA (417-431)	YTFRGFMSHTNNYPC	229
	SLA (359-373)	YNERLLHTPHNPISL	230
	SLA (215-229)	DCILCIHSTTSCFAP	231
	SLA (111-125)	SSLLNKITNSLVLDI	232
	SLA (110-124)	GSSLLNKITNSLVLD	233
	SLA (299-313)	NDSFIQEISKMYPGR	234
	SLA (342-356)	KEMFSYLSNQIKKLS	235
	SLA (49-63)	STLELFLHELAIMDS	236
	SLA (119-133)	NSLVLDIIKLAGVHT	237
	SLA (260-274)	SKCMHLIQQGARVGR	238
	SLA (26-40)	RSHEHLIRLLLEKKG	239
	SLA (86-100)	RRHYRFIHGIGRSGD	240
	SLA (331-345)	SNGYKKLLKERKEMF	241
	Antígeno relevante Hepatitis autoinmune (217- 236)	VVSSHYSRRFTPEIAKRPKV	242
Antígenos relevantes para la Uveitis	SAG (199-214)	QFFMSDKPLHLAVSLN	243
	SAG (199-213)	QFFMSDKPLHLAVSL	244
	SAG (77-91)	DVIGLTFRRDLYFSR	245
	SAG (250-264)	NVVLYSSDYVVKPVA	246
	SAG (172-186)	SSVRLIRKVQHAPL	247
	SAG (354-368)	EVPFRLMHPQPEDPA	248
	SAG (239-253)	KKIKAFVEQVANVVL	249
	SAG (102-116)	STPTKLQESLLKKLG	250
	SAG (59-73)	KKVYVTLTCAFRYQG	251
	SAG (280-294)	KTLTLLPLLANNRER	252
	SAG (291-306)	NRERRGIALDGKIKHE	253
	SAG (195-209)	EAAWQFFMSDKPLHL	254
	SAG (200-214)	QFFMSDKPLHLAVSL	255
Antígenos relevantes para el Síndrome de Sjögren	TROVE2 (127-141)	TFIQFKKDLKESMKC	256
	TROVE2 (523-537)	DTGALDVIRNFTLDM	257
	TROVE2 (243-257)	EVIHLIEEHRLVREH	258
	TROVE2 (484-498)	REYRKKMDIPAKLIV	259
	TROVE2 (347-361)	EEILKALDAAFYKTF	260
	TROVE2 (369-383)	KRFLLAVDVSASMNQ	261
	TROVE2 (426-440)	SSA/RO (426-440)	262
	TROVE2 (267-281)	EVWKALLQEMPLTAL	263

	TROVE2 (178-192)	SHKDLLRLSHLKPSS	264
	TROVE2 (358-372)	YKTFKTVEPTGKRFL	265
	TROVE2 (221-235)	ETEKLLKYLEAVEKV	266
	TROVE2 (318-332)	RIHPFHILIALETYK	267
	TROVE2 (407-421)	EKDSYVVAFSDEMVP	268
	TROVE2 (459-473)	TPADVFIIVFTDNETF	269
	TROVE2 (51-65)	QKLGLENAEALIRLI	270
	TROVE2 (312-326)	KLLKKARIHPFHILI	271
	SS-B (241-255)	DDQTCREDLHILFSN	272
	SS-B (101-115)	TDEYKNDVKNRSVYI	273
	SS-B (153-167)	SIFVVFDIESAKKF	274
	SS-B (178-192)	TDLLILFKDDYFAKK	275
	SS-B (19-33)	HQIEYYFGDFNLPRD	276
	SS-B (37-51)	KEQIKLDEGWVPLEI	277
	SS-B (133-147)	DKGQVLNIQMRRTLH	278
	SS-B (50-64)	EIMIKFNRLNRLTTD	279
	SS-B (32-46)	RDKFLKEQIKLDEGW	280
	SS-B (153-167)	SIFVVFDIESAKKF	281
	SS-B (83-97)	SEDKTKIRRSPSKPL	282
	SS-B (136-150)	QVLNIQMRRTLHKAF	283
	SS-B (297-311)	RNKEVTWEVLEGEVE	284
	SS-B (59-73)	NRLTTDFNVIVEALS	285
	SS-B (151-165)	KGSIFVVFDIESAK	286
	SS-B (86-100)	KTKIRRSPSKPLPEV	287
	SS-B (154-168)	IFVVFDIESAKKFV	288
Antígenos relevantes para la Escleroderma	TOP1 (346-360)	KERIANFKIEPPGLF	289
	TOP1 (420-434)	QGSIKYIMLNPSSRI	290
	TOP1 (750-764)	QREKFAWAIDMADED	291
	TOP1 (419-433)	IQGSIKYIMLNPSSR	292
	TOP1 (591-605)	YNASITLQQQLKELT	293
	TOP1 (695-709)	EQLMKLEVQATDREE	294
	TOP1 (305-319)	SQYFKAQTEARKQMS	295
	TOP1 (346-360)	KERIANFKIEPPGLF	296
	TOP1 (419-433)	IQGSIKYIMLNPSSR	297
	TOP1 (425-439)	YIMLNPSSRIKGEKD	298
	TOP1 (614-628)	KILSYNRRANRAVAIL	299
	CENP-C (297-311)	KLIEDEFIIDESDQS	300
	CENP-C (857-871)	KVYKTLDTFFFSTGK	301
	CENP-C (887-901)	QDILVFYVNFDDLCC	302

	CENP-C (212-226)	KVMLKKIEIDNKVSD	303
	CENP-C (643-657)	EDNIMTAQNVPLKPQ	304
	CENP-C (832-846)	TREIILMDLVRPQDT	305
	CENP-C (167-181)	TSVSQNVIPSSAQKR	306
	CENP-C (246-260)	RIRDSEYEIQRQAKK	307
	CENP-C (846-860)	TYQFFVKHGELKVYK	308
	CENP-C (149-163)	DEEFYLSVGSPSVLL	309
	CENP-C (833-847)	REIILMDLVRPQDTY	310
	CENP-C (847-861)	YQFFVKHGELKVYKT	311
Antígenos relevantes para el síndrome antifosfolípido	APOH (235-249)	HDGYSLDGPEEIECT	312
	APOH (306-320)	KCSYTEDAQCIDGTI	313
	APOH (237-251)	GYSLDGPEEIECTKL	314
	APOH (295-309)	KVSFFCKNKEKKCSY	315
	APOH (28-42)	DLPFSTVVPLKTFYE	316
	APOH (173-187)	ECLPQHAFMGNDTIT	317
	APOH (264-278)	CKVPVKKATVVYQGE	318
	APOH (295-309)	KVSFFCKNKEKKCSY	319
	APOH (49-63)	YSCKPGYVSRGGMRK	320
	APOH (269-283)	KKATVVYQGERVKIQ	321
	APOH (295-309)	KVSFFCKNKEKKCSY	322
	APOH321-355	EVPKCFKEHSSLAFW	323
	APOH322-336	VPKCFKEHSSLAFWK	324
	APOH324-338	KCFKEHSSLAFWKTD	325
Antígenos relevantes para la vasculitis asociada a ANCA	MPO (506-520)	QPFMFRLDNRYQPM	326
	MPO (302-316)	RIKNQADCIPFFRSC	327
	MPO (7-21)	SSLRCMVDLGPCWAG	328
	MPO (689-703)	QQRQALAQISLPRII	329
	MPO (248-262)	RSLMFMQWGQLLDHD	330
	MPO (444-458)	QEARKIVGAMVQIIT	331
	MPO (513-527)	DNRYQPMENPRVPL	332
	MPO (97-111)	ELLSYFKQPVAATRT	333
	MPO (616-630)	QLGTVLRNLKLARKL	334
	MPO (462-476)	YLPLVLGPTAMRKYL	335
	MPO (617-631)	LGTVLRNLKLARKLM	336
	MPO (714-728)	KNNIFMSNSYPRDFV	337
	PRTN3 (44-58)	SLQMRGNPGSHFCGG	338
	PRTN3 (234-248)	TRVALYVDWIRSTLR	339
	PRTN3 (59-73)	TLIHPSFVLTAACHCL	340

	PRTN3 (117-131)	NDVLLIQLSSPANLS	341
	PRTN3 (164-178)	DPPAQVLQELNVTVV	342
	PRTN3 (71-85)	HCLRDIPQRLVNVVL	343
	PRTN3 (241-255)	DWIRSTLRRVEAKGR	344
	PRTN3 (59-73)	TLIHPSFVLTAACHCL	345
	PRTN3 (183-197)	RPHNICTFVPRRKAG	346
	PRTN3 (62-76)	HPSFVLTAACHCLRDI	347
	PRTN3 (118-132)	DVLLIQLSSPANLSA	348
	PRTN3 (239-253)	YVDWIRSTLRRVEAK	349
Antígenos relevantes para el síndrome de la persona rígida	GAD (212-226)	EYVTLKKMREIIGWP	350
	GAD (555-569)	NFFRMVISNPAATHQ	351
	GAD (297-311)	DSVILIKCDERGKMI	352

Antígenos Relevantes Para El Cáncer

[0245] En ciertos aspectos, el antígeno relevante para la enfermedad es un antígeno relevante para el cáncer. En otros aspectos, el cáncer es carcinoma, sarcoma, mieloma, leucemia, linfoma o tipos mixtos de metástasis de estos u otros tipos de cáncer. Los ejemplos de antígenos relevantes para el cáncer o el tumor incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la Tabla 2.

10 Tabla 2 - Antígenos Relacionados Con El Cáncer

Antígenos Relacionados con el Cáncer	SEQ ID NO:
Lys Ile Ser Val Ser Leu Pro Leu Ser Leu Ser Gln Ser Val Cys	353
Gln Leu Ser Lys Asp Thr Ser Val Leu Thr Phe Thr Phe Cys	354
Cys Ser Asp Ala His Pro Gly Asp Ser Ser Gly Asp Ser Ser Gly Leu Asn	355
Arg Gly Glu Val Arg Gln Phe Thr Leu Arg His Trp Leu Lys Val	356
Gly Asp Tyr Leu Asn Asp Glu Ala Leu Trp Asn Lys Cys	357
Gly Lys Val Ile Asp Asp Asn Asp His Leu Ser Gln Glu Ile Cys	358
Leu Met Ala Asn Ser Thr Trp Gly Tyr Pro Phe His Asp Gly	359
Leu Asn Val Val Pro Trp Asn Leu Thr Leu Phe Ser Ile Leu	360

Thr His Ser Phe Thr Ala Phe Lys Arg His Val Cys	361
Asn Leu Ser Leu Pro Pro Ser Leu Ser Leu Ser Ile Cys	362
Glu Arg Pro Ser Ser Val Leu Thr Ile Tyr Asp Ile Gly Ile Gln Cys	363
Cys Tyr Gln Gln Tyr Thr Asn Leu Gln Glu Arg Pro Ser Ser Val	364
Thr Val Glu Pro Glu Thr Gly Asp Pro Val Thr Leu Arg Leu Cys	365
Cys Ser Arg Lys Lys Arg Ala Asp Lys Lys Glu Asn Gly Thr Lys Leu Leu	366
Phe Leu Leu Val Leu Gly Phe Ile Ile	367
Val Leu Pro Ser Val Ala Met Phe Leu	368
Leu Val Leu Gly Phe Ile Ile Ala Leu	369
Lys Val Val Thr Ser Ser Phe Val Val	370
Leu Val Pro Gly Thr Lys Phe Tyr Ile	371
Leu Leu Pro Ile Arg Thr Leu Pro Leu	372
Tyr Leu Val Lys Lys Gly Thr Ala Thr	373
Ser Leu Phe Ala Glu Thr Ile Trp Val	374
Met Leu Ile Ala Met Tyr Phe Tyr Thr	375
Leu Met Trp Thr Leu Pro Val Met Leu	376
Met Leu Ile Val Tyr Ile Phe Glu Cys	377
Tyr Ile Phe Glu Cys Ala Ser Cys Ile	378
Leu Val Leu Met Leu Ile Val Tyr Ile	379
Ala Leu Cys Arg Arg Arg Ser Met Val	380
Leu Leu Ser Gly Leu Ser Leu Phe Ala	381
Phe Leu Leu Val Val Gly Leu Ile Val	382
Leu Val Val Gly Leu Ile Val Ala Leu	383
Lys Val Val Lys Ser Asp Phe Val Val	384
Thr Leu Pro Val Gln Thr Leu Pro Leu	385
Asp Leu His Val Ile Ser Asn Asp Val	386
Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu	387
Phe Leu Arg Pro Gly Asp Asp Ser Ser	388
Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser	389
Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu His Val	390
Glu Leu Ala His Tyr Asp Val Leu Leu	391
Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu	392
Thr Leu Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu	393
Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu	394
Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val	395
Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val	396
Val Leu Ala Lys Glu Leu Lys Phe Val	397
Ile Leu Leu Trp Gln Pro Ile Pro Val	398
Asp Leu Phe Gly Ile Trp Ser Lys Val	399

Pro Leu Glu Arg Phe Ala Glu Leu Val	400
Lys Gln Gly Asn Phe Asn Ala Trp Val	401
Asn Leu Leu Arg Arg Met Trp Val Thr	402
Asn Leu Phe Glu Thr Pro Ile Leu Ala	403
Asn Leu Phe Glu Thr Pro Val Glu Ala	404
Gly Leu Gln His Trp Val Pro Glu Leu	405
Val Gln Phe Val Ala Ser Tyr Lys Val	406
Arg Leu Leu Ala Ala Leu Cys Gly Ala	407
Leu Leu Leu Leu Thr Val Leu Thr Val	408
Leu Leu Leu Thr Val Leu Thr Val Val	409
Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu	410
Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val	411
Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu	412
Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val	413
Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val	414
Ala Leu Ala Ser Thr Ala Pro Pro Val	415
Ala Ile Leu Cys Trp Thr Phe Trp Val	416
Phe Ile Leu Met Phe Ile Val Tyr Ala	417
Leu Thr Ala Glu Cys Ile Phe Phe Val	418
Met Leu Gln Asp Asn Cys Cys Gly Val	419
Ile Leu Cys Trp Thr Phe Trp Val Leu	420
Lys Ile Leu Leu Ala Tyr Phe Ile Leu	421
Phe Val Gly Ile Cys Leu Phe Cys Leu	422
Val Leu Leu Ser Val Ala Met Phe Leu	423
Leu Leu Ser Val Ala Met Phe Leu Leu	424
Ile Leu Gly Ser Leu Pro Phe Phe Leu	425
Ile Leu Asn Ala Tyr Leu Val Arg Val	426
Phe Leu Leu Val Gly Phe Ala Gly Ala	427
Asn Leu Gln Pro Gln Leu Ala Ser Val	428
Cys Met Phe Asp Ser Lys Glu Ala Leu	429
Tyr Leu Tyr Val Leu Val Asp Ser Ala	430
Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val	431
Lys Met Ala Arg Phe Ser Tyr Ser Val	432
Gly Leu Val Met Asp Glu His Leu Val	433
Phe Leu Pro Gly Cys Asp Gly Leu Val	434
Cys Met Leu Gly Ser Phe Cys Ala Cys	435
Tyr Leu Ala Phe Arg Asp Asp Ser Ile	436
Trp Leu Pro Lys Lys Cys Ser Leu Cys	437
Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Met Leu	438
Met Leu Val Gly Ile Cys Leu Ser Ile	439

Phe Glu Leu Gly Leu Val Ala Gly Leu	440
Lys Met Val Arg Phe Ser Tyr Ser Val	441
Cys Leu Asn Glu Gly Thr Cys Met Leu	442
Met Leu Ala Gly Ile Cys Leu Ser Ile	443
Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu	444
Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu	445
Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met Glu Val	446
Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val	447
Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Val	448
Ser Leu Phe Leu Gly Ile Leu Ser Val	449
Ala Ile Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile	450
Phe Ile Arg Ala His Thr Pro Tyr Ile	451
Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr	452
Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile	453
Ser His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu	454
Tyr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Ser Val	455

[0246] Otros antígenos relevantes para el cáncer incluyen los resumidos en las Tablas de esta base de datos en línea <http://cancerimmunity.org/peptide/> e incorporados aquí
5 como referencia, referenciados por última vez el 6 de mayo de 2015.

[0247] Se contempla que, en las composiciones de la descripción, hay entre aproximadamente 0.001 mg y aproximadamente 10 mg de proteína total por ml en la
10 composición. También se contempla que una dosis efectiva sea de aproximadamente 0.0004 mg/kg a aproximadamente 2.027 mg/kg, medida por pMHC, y oscila entre 0.0004 mg/kg a aproximadamente 2.027 mg/kg. Por lo tanto, la concentración de proteína en una composición puede ser aproximadamente, al
15 menos aproximadamente o como máximo aproximadamente 0.001,

0.010, 0.050, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 50, 100 µg/ml o mg/ml o más (o cualquier rango derivable en el mismo) De esto,

5 aproximadamente, al menos aproximadamente, o como máximo aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58,

10 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% pueden ser péptido/MHC/complejo de nanopartículas.

[0248] Además, la Patente de Estados Unidos No.

15 4,554,101 (Hopp), que se incorpora aquí como referencia, enseña la identificación y preparación de epítomos a partir de secuencias de aminoácidos primarias sobre la base de la hidrofilia. A través de los métodos descritos en Hopp, un experto en la materia podría identificar epítomos potenciales

20 dentro de una secuencia de aminoácidos y confirmar su inmunogenicidad. También se han dedicado numerosas publicaciones científicas a la predicción de la estructura secundaria y a la identificación de epítomos, a partir de análisis de secuencias de aminoácidos (Chou y Fasman, 1974a,

b; 1978a, b; 1979). Cualquiera de estos puede usarse, si se desea, para complementar las enseñanzas de Hopp en la Patente de los Estados Unidos No. 4,554,101.

Citoquinas

5 [0249] En cierto aspecto, los NP comprenden, además, o alternativamente consisten esencialmente en, o además consisten en, al menos una molécula de citocina. Como se usa en el presente documento, el término "citocina" abarca proteínas de bajo peso molecular secretadas por varias

10 células en el sistema inmunitario que actúan como moléculas de señalización para regular una amplia gama de procesos biológicos dentro del cuerpo a nivel molecular y celular. Las "citocinas" incluyen proteínas inmunomoduladoras individuales que se incluyen en la clase de linfocinas, interleucinas o

15 quimiocinas.

[0250] En el presente documento se describen ejemplos no limitantes. Por ejemplo, IL-1A e IL-1B son dos miembros distintos de la familia humana de interleucina-1 (IL-1). La IL-1A madura es una proteína de 18 kDa, también conocida como

20 factor de activación de fibroblastos (FAF), factor de activación de linfocitos (LAF), factor de activación de células B (BAF), mediador endógeno de leucocitos (LEM), etc. IL- 4 es una citocina que induce la diferenciación de células T helper-2 (Th2), y está estrechamente relacionada y tiene

funciones similares a IL-13. La IL-5 es producida por células Th2 y mastocitos. Actúa para estimular el crecimiento de células B y aumentar la secreción de inmunoglobulina. También está involucrado en la activación de eosinófilos. IL-6 es una

5 interleucina que puede actuar como una citocina proinflamatoria o antiinflamatoria. Es secretada por las células T y los macrófagos para estimular la respuesta inmune al trauma u otro daño tisular que conduce a la inflamación. La IL-6 también se produce a partir del músculo en respuesta

10 a la contracción muscular. La IL-8 es una quimiocina producida por macrófagos y otros tipos de células, como las células epiteliales y las células endoteliales, y actúa como un mediador importante de la reacción inmune en la respuesta innata del sistema inmune. IL-12 está implicada en la

15 diferenciación de células T vírgenes a células T auxiliares (Th1 o Th2). Como una citocina heterodimérica, la IL-12 se forma después de que dos subunidades codificadas por dos genes separados, IL-12A (p35) e IL-12B (p40), se dimerizan después de la síntesis de proteínas. IL-12p70 indica esta

20 composición heterodimérica. La IL-13, una citocina secretada por muchos tipos de células, especialmente las células Th2, es un mediador importante de la inflamación alérgica y la enfermedad. La IL-17 es una citocina producida por las células T auxiliares y es inducida por la IL-23, lo que

resulta en daño destructivo del tejido en reacciones de tipo retardado. La función IL-17 es una citocina proinflamatoria que responde a la invasión del sistema inmune por patógenos extracelulares e induce la destrucción de la matriz celular del patógeno. IP-10, o la proteína 10 inducida por interferón gamma, también se conoce como quimiocina 10 con motivo C-X-C (CXCL10) o citocina B10 de pequeña capacidad inducible. Como una pequeña citocina perteneciente a la familia de quimiocinas CXC, IP-10 es secretada por varios tipos de células (incluidos monocitos, células endoteliales y fibroblastos) en respuesta a IFN- γ . Las proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP) pertenecen a la familia de las quimiocinas. Hay dos formas principales de MIP humano, MIP-1 α y MIP-1 β , que también se conocen como quimiocinas (Motivo C-C) ligando 3 (CCL3) y CCL4, respectivamente. Ambos son producidos por macrófagos después de la estimulación con endotoxinas bacterianas. El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF o GCSF), también conocido como factor estimulante de colonias 3 (CSF 3), es una hormona factor estimulante de colonias. G-CSF es una glicoproteína, factor de crecimiento y citocina producida por varios tejidos diferentes para estimular la médula ósea para producir granulocitos y células madre. G-CSF también estimula la supervivencia, proliferación, diferenciación y función de

precusores de neutrófilos y neutrófilos maduros. El factor de crecimiento epidérmico o EGF es un factor de crecimiento que juega un papel importante en la regulación del crecimiento celular, la proliferación y la diferenciación al

5 unirse con alta afinidad a su receptor EGFR. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una familia de factores de crecimiento que son proteínas de señalización importantes involucradas tanto en la vasculogénesis (la formación de novo del sistema circulatorio embrionario) como

10 en la angiogénesis (el crecimiento de los vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente).

[0251] La citocina o las citocinas se pueden acoplar a la nanopartícula de la misma manera que el complejo pMHC. En una realización de la presente descripción, la citocina o las

15 citocinas y el complejo pMHC se unen por separado a la nanopartícula. En otra realización de la divulgación, la molécula de citocina o citocinas y el complejo pMHC se acoplan primero juntos y luego se acoplan posteriormente a la nanopartícula. Se pueden acoplar múltiples citocinas a la

20 nanopartícula; Estos pueden ser múltiples de la misma citocina o de diferentes citocinas.

Componentes De La Molécula Coestimuladora

[0252] En ciertos aspectos, los NP comprenden adicionalmente, o alternativamente consisten esencialmente

en, o aún consisten además en al menos una molécula coestimuladora. Las moléculas coestimuladoras son moléculas que producen una señal secundaria in vivo que sirve para activar células T vírgenes en células T específicas de antígeno capaces de producir una respuesta inmune a las células que poseen dicho antígeno específico. La presente descripción no se limita a ninguna molécula coestimuladora específica. Las diversas moléculas coestimuladoras son bien conocidas en la técnica. Algunos ejemplos no limitantes de moléculas coestimuladoras son 4-1BBL, OX40L, CD40, IL-15/IL-15Ra, CD28, CD80, CD86, CD30L e ICOSL. Solo una molécula coestimuladora específica puede estar acoplada a una nanopartícula o una variedad de moléculas coestimuladoras puede estar acoplada a la misma nanopartícula. En ciertas realizaciones, la molécula coestimuladora es una proteína tal como un anticuerpo que es capaz de agonizar un receptor coestimulador en una célula T. En este caso, el anticuerpo es capaz de inducir una señal coestimuladora que es necesaria para activar las células T vírgenes e inducir una respuesta inmune de una manera específica de antígeno. Adicional o alternativamente, el término "molécula coestimuladora" como se usa en el presente documento también puede referirse a un agente capaz de generar una señal coestimuladora al tener un efecto agonista en una molécula de señalización

coestimuladora nativa, por ejemplo, anti CD28 o CD28 ligando que genera una respuesta coestimuladora de CD28. En algunos aspectos, la valencia de las moléculas coestimuladoras es de aproximadamente 1 a aproximadamente 6000, o la valencia de las moléculas coestimuladoras es de aproximadamente 1 a aproximadamente 6000, cada una por núcleo de nanopartículas.

Composiciones

[0253] En ciertos aspectos, se proporcionan en el presente documento composiciones que comprenden una pluralidad de los complejos proporcionados en el presente documento. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden además un vehículo, opcionalmente un vehículo farmacéutico. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden comprender opcionalmente uno o más núcleos de nanopartículas acoplados a una o más moléculas coestimuladoras o citocinas. Por consiguiente, en algunas realizaciones, las composiciones comprenden, o alternativamente, consisten esencialmente en, o además consisten en: 1) una pluralidad de núcleos de nanopartículas acoplados a una pluralidad de complejos antígeno-MHC en los que al menos una porción de los núcleos de nanopartículas comprende además uno o más moléculas coestimuladoras o una o más citocinas, y una segunda porción de los núcleos de nanopartículas no comprende además una molécula

coestimuladora o una citocina, y 2) una pluralidad de núcleos de nanopartículas acoplados a uno o más moléculas coestimuladoras o citocinas.

Métodos De Fabricación De Nanopartículas Y Complejos De pMHC

- 5** [0254] Los pMHC-NP y las nanopartículas pueden prepararse mediante una variedad de métodos como se describe, por ejemplo, en WO 2008/109852, WO 2012/041968, WO 2012/062904, WO 2013/144811, WO 2014/050286, WO 2015/063616, WO 2016/198932, o PCT/IB2017/001508.

10 Ejemplos

- [0255] Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de ilustrar diversas realizaciones de la divulgación y no pretenden limitar la presente divulgación de ninguna manera. Un experto en la materia apreciará fácilmente que la presente
- 15** descripción está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como aquellos objetos, fines y ventajas inherentes en este documento. Los presentes ejemplos, junto con los métodos descritos en el presente documento, son actualmente representativos de
- 20** realizaciones y son ejemplares, y no pretenden ser limitaciones del alcance de la divulgación. Los cambios en el mismo y otros usos que están abarcados dentro del espíritu de la divulgación tal como se define por el alcance de las reivindicaciones ocurrirán a los expertos en la materia.

Métodos

[0256] **Ratones**. Los ratones NOD/Lt eran de Jackson Lab (Bar Harbor, ME). Se han descrito 19.4 α /8.3 β (8.3-NOD) y ratones BDC2.5-NOD (que expresan receptores de células T transgénicas para IGRP206-214 o NRP-V7/Kd y 2.5mi/IAg7, respectivamente) 19, 20, 21.

[0257] **Producción de pMHC**. Se utilizaron dos métodos diferentes para expresar complejos pMHC de clase I recombinantes. El primero consistió en replegar cadenas pesadas y ligeras de MHC de clase I expresadas en bacterias en presencia de péptidos, seguido de purificación mediante filtración en gel y cromatografía de intercambio aniónico²², 23. El segundo consistió en expresar complejos de MHC de clase I con altos rendimientos en micoplasma libre células de ovario de hámster chino (CHO) de estilo libre transducidas lentivirales como construcciones de cadena única en las que la secuencia que codifica el péptido, las cadenas ligeras y pesadas de MHC de clase I están unidas secuencialmente con conectores flexibles de glicina-serina (GS) ²⁴ seguidos por un conector carboxiterminal que codifica un sitio BirA, y 6xHis y Strep Tags que terminan con una cisteína libre. Las proteínas secretadas se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo usando una etiqueta de estreptococo o columnas de níquel y se usaron directamente para el recubrimiento NP o se

biotinilaron para producir tetrameros de pMHC usando estreptavidina conjugada con fluorocromo.

[0258] Los monómeros pMHC de clase II recombinantes se produjeron en células CHO de estilo libre transducidas con
 5 lentivirus que codifican un mensaje monocistrónico en el que las cadenas péptido-MHC α y MHC β del complejo se separaron mediante la secuencia P2A que omite el ribosoma. Se añadió un conector que codifica un sitio BirA, Strep Tags o 6xHis, y un Cys libre al extremo carboxiterminal de la construcción. Los
 10 complejos de pMHC de clase II autoensamblados se purificaron de los sobrenadantes de cultivo mediante cromatografía de afinidad de níquel y se usaron para recubrir NPs o se procesaron para biotinilación y formación de tetrameros como se describió anteriormente.

15 [0259] **Síntesis de NP.** Las nanopartículas de oro (PNB) se sintetizaron mediante reducción química del ácido cloroaúrico (HAuCl₄) con citrato de sodio como se describe (Perrault, S.D. et al. (2009) Nano Lett. 9 (5):1909-1915). Brevemente, se añadieron 2 ml de 1% de HAuCl₄ (Sigma Aldrich,
 20 Oakville, ON) a 100 ml de H₂O bajo agitación vigorosa y la solución se calentó en un baño de aceite. Se añadieron seis (para GNP de 14 nm) o dos ml (para GNP de 40 nm) de citrato de sodio al 1% a la solución de HAuCl₄ hirviendo, que se agitó durante 10 minutos adicionales y luego se enfrió a

- temperatura ambiente. Los PNB se estabilizaron mediante la adición de 1 μM de conectores de tiol-polietilenglicol (tiol-PEG) (Nanocs, MA) funcionalizados con clústers carboxilo ($-\text{COOH}$) o amina primaria ($-\text{NH}_2$) como aceptadores de pMHC. Los
- 5** GNP pegilados se lavaron con agua para eliminar el tiol-PEG libre, se concentraron y se almacenaron en agua para su posterior análisis. La densidad de NP se calculó a partir de mediciones de espectrofotometría de acuerdo con la ley de Beer.
- 10** [0260] Los NP de óxido de hierro (Fe_3O_4) de la serie SFP se produjeron por descomposición térmica de acetilacetato de hierro en disolventes orgánicos en presencia de tensioactivos, luego se convirtió en disolvente en tampones acuosos por pegilación (Xie, J. et al. (2007) Adv Materials
- 15** 19 (20): 3163-3166; Xie, JPS et al. (2006) Pure Appl Chem 78 (5):1003-1014; Xu, C. et al. (2007) Polymer International 56 (7): 821-82). En resumen, se disolvieron 2 mmol de Fe (acac) 3 (Sigma Aldrich) en una mezcla de 10 ml de bencil éter y oleilamina y se calentaron a 100°C durante 1 hora seguido de
- 20** 300°C durante 2 horas con reflujo bajo la protección de un nitrógeno cobija. Los NP sintetizados se precipitaron mediante la adición de etanol y se resuspendieron en hexano. Para la pegilación de los NP de óxido de hierro, se disolvieron 100 mg de diferentes conectores de PEG conjugado

con dopamina (DPA-PEG, 3.5 kDa) (Jenkem Tech USA) en una mezcla de cloroformo y dimetilformamida (DMF). La solución NP (20 mg Fe) se añadió luego a la solución DPA-PEG y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. Los NP de SFP pegilados se precipitaron durante la noche mediante la adición de hexano y se resuspendieron en agua. Se eliminaron las trazas de agregados por centrifugación a alta velocidad (20,000xg, 30 min). Los monodispersos NP de SFP se almacenaron en agua para la conjugación de pMHC. La concentración de hierro se determinó por espectrofotometría a 410 nm en ácido clorhídrico 2N (HCl). Basado en la estructura molecular y el diámetro de los NP de SFP (Fe₃O₄; 8 + 1 nm de diámetro) (Xie, J. et al. (2007) Adv Materials 19 (20): 3163-3166; Xie, JPS et al. (2006) Pure Appl Chem 78 (5):1003-1014), el solicitante estimó que las soluciones de SFP que contienen 1 mg de hierro contienen 5x10¹⁴ NP.

[0261] Posteriormente, el solicitante desarrolló un nuevo diseño de NP de óxido de hierro que permitió la formación, también por descomposición térmica, pero en un solo paso, de NP de óxido de hierro pegilado en ausencia total de tensioactivos (NP de óxido de hierro de la serie PF). En este diseño, se usaron moléculas de PEG como agente de recubrimiento de superficie in situ. En una reacción típica, 3 g de PEG (2 kDa MW) se fundieron lentamente en un

matraz de ebullición de fondo redondo de 50 ml a 100°C y luego se mezclaron con 7 ml de bencil éter y 2 mmol de Fe (acac) 3. La reacción se agitó vigorosamente durante 1 hora y se calentó a 260°C con reflujo durante 2 horas adicionales.

5 La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se transfirió a un tubo de centrifugación y se mezcló con 30 ml de agua. Los materiales insolubles se eliminaron por centrifugación a 2.000xg durante 30 minutos. Las moléculas de PEG libres se eliminaron por ultrafiltración a través de

10 filtros Amicon-15 (MWCO 100 kDa, Millipore, Billerica, MA). Los NP de óxido de hierro se generaron con la mayoría, aunque no todas las moléculas de PEG analizadas. Los tamaños de los NP de óxido de hierro variaron dependiendo de los clústers funcionales de los conectores de PEG utilizados en las

15 reacciones de descomposición térmica. Los NP podrían purificarse fácilmente usando columnas magnéticas (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) o un sistema de separación celular IMag (BD BioSciences, Mississauga, ON). Los NP de óxido de hierro purificados se almacenaron en agua a

20 temperatura ambiente o 4°C sin ninguna agregación detectable. La densidad de NP se calculó como se describió anteriormente para los NP de SFP.

[0262] **Conjugación de pMHC a NP.** La conjugación de pMHC a NP producidos con conectores PEG que transportan clústers

de amina primaria distal (-NH₂) o carboxilo (-COOH) se logró mediante la formación de enlaces amida en presencia de -Etil-3-[3-dimetilaminopropil]hidrocloruro de carbodiimida (EDC). NPs (GNP-C, SFP-C y PF-C) con los clústers -COOH se

5 disolvieron primero en tampón de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) 20 mM, pH 5,5. La sal de sodio de N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS; 10 mM) y EDC (1 mM) (Thermo Scientific, Waltham, MA) se agregaron a la solución de NP. Después de 20 minutos de agitación a temperatura

10 ambiente, la solución NP se añadió gota a gota a la solución de monómero pMHC (en tampón de borato 20 mM, pH 8,2). La mezcla se agitó durante 4 h adicionales. Para conjugar pMHCs con NPs funcionalizados con NH₂ (GNP-N, SFP-N y PF-N), los complejos de pMHC se disolvieron primero en tampón MES 20 mM,

15 pH 5.5, que contenía cloruro de sodio (NaCl) 100 mM. Luego se añadieron sulfo-NHS (10 mM) y EDC (5 mM) a la solución de pMHC. Las moléculas de pMHC activadas se añadieron a la solución NP en tampón de borato 20 mM (pH 8,2) y se agitaron durante 4 horas a temperatura ambiente.

20 [0263] Para conjugar pMHC a NP funcionalizados con maleimida (SFP-M y PF-M), las moléculas de pMHC diseñadas para codificar un Cys C-terminal libre se mezclaron con NP en tampón fosfato 40 mM, pH 6,0, que contiene ácido etilendiaminotetraacético 2 mM (EDTA), NaCl 150 mM, y se

incubó durante la noche a temperatura ambiente. Los pMHC se unieron covalentemente con NP mediante la formación de un enlace carbono-azufre entre los clústers maleimida y el residuo Cys.

- 5** [0264] La química de clics se usó para conjugar pMHC con NP funcionalizados con clústers azida (SFP-Z). Para esta reacción, las moléculas de pMHC se incubaron primero con dibenzociclooctino-N-hidroxisuccinimidil éster (DBCO-NHS, Click Chemistry Tools, Scottsdale, AZ) durante 2 horas a
- 10** temperatura ambiente. Las moléculas de DBCO libres se eliminaron por diálisis durante la noche. Los conjugados de pMHC-DBCO se incubaron luego con SFP-Z durante 2 horas, dando como resultado la formación de enlaces triazol entre las moléculas de pMHC y NP.
- 15** [0265] Los complejos de pMHC no conjugados en las diferentes reacciones conjugadas de pMHC-NP se eliminaron mediante diálisis extensa contra PBS, pH 7.4, a 4°C aunque membranas de corte de peso molecular de 300 kDa (laboratorios Spectrum). Alternativamente, los NP de óxido de hierro
- 20** conjugado con pMHC se purificaron por separación magnética. Los NP conjugados se concentraron por ultrafiltración a través de unidades Amicon Ultra-15 (100 kDa MWCO) y se almacenaron en PBS.

[0266] **Caracterización de NP.** El tamaño del núcleo y la

dispersión de los NP no conjugados y conjugados con pMHC se evaluaron primero mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, Hitachi H7650). La dispersión dinámica de la luz (DLS, Zetasizer, Malvern, Reino Unido) se utilizó para

5 determinar el tamaño hidrodinámico de NPs y pMHC-NPs. La naturaleza química del núcleo de óxido de hierro de la serie PF de NP se evaluó mediante difracción de haz de electrones de ángulo pequeño (SEBD). Las propiedades químicas de la superficie se evaluaron mediante espectroscopía infrarroja

10 por transformada de Fourier (FTIR). Los NP conjugados con pMHC se analizaron mediante PAGE nativa y desnaturalizante, ensayo de Bradford, análisis de aminoácidos y ensayo de inmunosorbente unido a enzima de punto (ELISA de punto).

[0267] **Espectroscopía Infrarroja De Transformación De**

15 **Fourier (FTIR)**. Las propiedades químicas de la superficie de los diseños de NP de óxido de hierro de la serie PF se evaluaron mediante Espectroscopía Infrarroja De Transformación De Fourier (FTIR). Los espectros FTIR de control PEG y PEG anclado en la superficie PF-NP se

20 obtuvieron usando un espectrofotómetro Nicolet FTIR en un modo ATR (reflexión total atenuada). Cada uno de los espectros se registró como el promedio de 256 exploraciones a una resolución espectral de 4 cm⁻¹. Se identificaron las firmas de vibración molecular de la columna vertebral de PEG

(representada por la vibración de estiramiento asimétrica C-H, la vibración C-O-C y la vibración oscilante CH₂) y sus clústers funcionales aceptores distales de pMHC.

5 [0268] La electroforesis en gel de agarosa. Para evaluar rápidamente los cambios en la carga de NP en función de la pegilación o el recubrimiento de pMHC, los NP se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. Las NP pegiladas migraron a polos negativos o positivos dependiendo de la carga superficial total.

10 [0269] La electroforesis en gel de poliacrilamida nativa y desnaturalizante. Los NP conjugados de pMHC se sometieron a análisis de PAGE nativo y SDS-PAGE (10%) para confirmar la ausencia de pMHC libre (no conjugado) en las preparaciones de pMHC-NP y para confirmar la presencia de complejos de pMHC
15 trimoleculares intactos en la superficie del NP.

[0270] mediciones de valencia de pMHC. Para evaluar el número de monómeros de pMHC conjugados en NP individuales (valencia de pMHC), el solicitante midió la concentración de pMHC de las preparaciones de pMHC-NP utilizando diferentes
20 enfoques, incluido el ensayo de Bradford (Thermo Scientific), análisis de aminoácidos (cuantificación basada en HPLC de 17 diferentes aminoácidos en preparaciones hidrolizadas de pMHC-NP (Universidad de Toronto) y ensayo de inmunoadsorción ligada a enzimas de puntos (Dot ELISA), y los valores se

convirtieron en proporciones de número molecular de pMHC a número de NP. Brevemente, en el enfoque de "Dot ELISA", las soluciones de NP y de monómeros pMHC conjugados y no conjugados (como estándares) se diluyeron en serie en PBS y se absorbieron en una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) en una placa de filtro de pocillos múltiples (PALL Corporation). La placa se dejó secar a temperatura ambiente y luego se incubó con anticuerpos primarios específicos de pMHC (es decir, anti β 2M y anticuerpos anti Kd para NP recubiertos con pMHC clase I, clones 2M2 y SF1-1.1, respectivamente; BioLegend, San Diego, CA), seguido de anticuerpos secundarios conjugados con HRP o AP. Tras el desarrollo de las reacciones enzimáticas del color, los contenidos de los pocillos se transfirieron a los pocillos de una placa ELISA convencional y se midió su absorbancia a 450 nm usando un lector de placas. Dado que los valores generados por estos diferentes métodos fueron similares, el ensayo de Bradford (utilizando NP no conjugados como espacios en blanco) se convirtió en el método de elección para facilitar y simplificar.

[0271] **Señalización De TCR En Células JurMA Transfectadas Con TCR/mCDA.** Los ADNc de TCR α y TCR β que codifican BDC2.5-TCR se generaron a partir de ARNm derivado de células T BDC2.5-CD4⁺ utilizando el sistema RACE 5' para la amplificación rápida de extremos de ADNc, kit de versión

2.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) y cebadores de oligonucleótidos específicos de TCR α o TCR β . Los productos de PCR resultantes se clonaron en el plásmido pCR8 y se secuenciaron. Los ADNc de longitud completa se subclonaron
 5 luego en un vector retroviral aguas arriba de un casete IRES-eGFP, como un marco de lectura abierto único en el que los ADNc TCR α y TCR β se separaron mediante una secuencia de salto de ribosoma P2A.

[0272] La secuencia de polipéptidos de la proteína de
 10 fusión TCR α -P2A-TCR β se proporciona en el Listado de Secuencias de ejemplo que se proporciona a continuación.

[0273] La secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de fusión TCR α -P2A-TCR β se proporciona en el Listado de Secuencias de ejemplo que se proporciona a continuación.

15 [0274] La línea celular marcadora humana CD3+/TCR β - JurMA (diseñada para expresar luciferasa impulsada por NFAT) se transdujo con un retrovirus que codifica CD4 murino mediante cocultivo con la línea celular GP+envAm12 productora de retrovirus. Las células transducidas se expandieron, se
 20 tiñeron con anti mCD4 conjugado con Pacific Blue (GK1.5) (BioLegend, San Diego, CA) y se clasificaron con un BD FACS Aria II (BD Biosciences, NJ). Las células CD4+ Jurkat/MA se transdujeron luego con un retrovirus que codifica BDC2.5-TCR $\alpha\beta$ e IRES-eGFP. Las células eGFP y mCD4 doblemente

positivas se clasificaron por citometría de flujo y se tiñeron con tetrámeros de pMHC BDC2.5/IAg7 marcados con PE para confirmar su especificidad.

[0275] Para medir la expresión de luciferasa impulsada por NFAT, se sembraron células JurMA de tipo salvaje y BDC2.5/mCD4+ en una placa de 48 pocillos a 500,000 células/pocillo en 200 μ l de DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado con 10% de FBS (Sigma-Aldrich), L-glutamina 20 mM (Sigma-Aldrich), piruvato de sodio 10 mM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y antibióticos, en presencia o ausencia de 20 ng/ml PMA (Sigma-Aldrich) más Ionomicina 0.5 μ M (Sigma-Aldrich), 10 μ g/ml de mAb hCD3 ϵ (OKT3, BD Biosciences) o 12.5 μ g/ml de PF-M recubierto con BDC2.5/IAg7. Las células se recogieron de los pocillos en diferentes momentos después de la estimulación, se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se lavaron 3 veces con PBS. Se transfirieron 105 células a una nueva placa de 96 pocillos, se lisaron en 20 μ l de reactivo de lisis de cultivo celular (Promega, Madison, WI) y se incubaron con 100 μ l de reactivo de ensayo de luciferasa (Promega) en placas blancas opacas (Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, Austria) utilizando un luminómetro de microplacas Veritas™ (Promega) con inyectores. La actividad de luciferasa se expresó como unidades de luminiscencia relativa (URL), normalizadas a la

actividad de luciferasa de las células no estimuladas.

[0276] **Actividad Agonista De pMHC-NP In Vitro.** Las células CD8+ o CD4+ esplénicas clasificadas por FACS de ratones transgénicos TCR (2.5x10⁵ células/ml) se incubaron con un rango de concentraciones de NP conjugado o control pMHC durante 24-48 ha 37°C. Los sobrenadantes se analizaron para IFN γ por ELISA.

[0277] La capacidad de respuesta de los clones de células T humanas a mAb agonistas y NP recubiertos con pMHC se evaluó cultivando 5x10⁵ células T clonales en placas de 48 pocillos, en 500 μ l de medio RPMI-1640 completo que contiene anti CD3/anti CD28 Cuentas recubiertas de mAb (Life Technologies; en una relación de bolas a célula de 1:1), PF-M recubierto con PPI76-90 (88S)/DRB1*0401 (50 μ g de péptido/MHC/ml) o un producto idéntico número de control, PF-M recubierto con Cys. El día 2, se recogieron los sobrenadantes para análisis de contenido de citoquinas por Luminex y se recogieron gránulos de células para extracción de ARN. En otros experimentos, los clones de células T se incubaron con PF-M recubierto con PPI76-90 (88S)/DRB1*0401 o PF-M recubierto con Cys durante hasta 5 días. Las células se recogieron los días 0, 2, 3, 4 y 5 y se usaron para la extracción de ARN.

[0278] **Microscopía Electrónica De Transmisión (TEM)**

de pMHC-NP/Conjugados Celulares. Las células BDC2.5-CD4⁺ y 8.3-CD8⁺ (5x10⁶/mL), aisladas de animales transgénicos TCR usando biotina-estreptavidina CD4⁺ o kits de enriquecimiento de linfocitos T CD8⁺ (BDC ImagTM, BD Biosciences), se incubaron con 2.5mi/NP de PF-M recubiertos con IAg7 y NRP-V7/Kd durante 30 minutos a 4°C (15-20 µg/ml de pMHC). Los cultivos se incubaron adicionalmente a 37°C durante los períodos de tiempo indicados, se lavaron con PBS frío para eliminar los NP de PF-M no unidos, se fijaron y seccionaron (70 nm) para obtener imágenes TEM con un Hitachi H7650.

[0279] **Microscopía De Súper Resolución.** Las células T 8.3-CD8⁺ purificadas se incubaron con NP NRP-V7/Kd-PF-M-Alexa-647 a 4°C durante 30 minutos o a 37°C durante otra hora. Las células se lavaron tres veces con PBS frío pH 7,4, luego se fijaron en PFA al 2% durante 15 minutos en hielo. Después del lavado, las células se tiñeron con 1 µg/ml de DAPI a temperatura ambiente durante 5 minutos, se montaron y se observaron bajo un microscopio de súper resolución (ELYRA 131, Zeiss). El procesamiento de imágenes y el análisis cuantitativo del diámetro del clúster se realizaron con el software ZEN 2012 (n = 100).

[0280] La microscopía electrónica de barrido (SEM) y la espectrometría de rayos X de pMHC-NP/conjugados celulares. Los macrófagos peritoneales inducidos por tioglicolato y las

DC derivadas de médula ósea se prepararon como se describió anteriormente. Las células T BDC2.5-CD4⁺ y 8.3-CD8⁺ se seleccionaron negativamente de bazos de ratón BDC2.5-NOD o 8.3-NOD usando kits de enriquecimiento de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ de biotina-estreptavidina (BD Imag™, BD Biosciences). Las células se colocaron en un cubreobjetos y se incubaron con PF-M no conjugado o conjugado con Cys, BDC2.5mi/IAg7-PF-M o NRP-V7/Kd-PF-M a 4°C durante 30 minutos con/sin 60 adicionales o incubaciones de 180 minutos a 37°C. Después de la incubación, las células se lavaron con tampón de cacodilato (CB) 0.05 M pH 7.4, luego se fijaron con glutaraldehído al 2.5% a 4°C durante la noche. Las muestras se sometieron a deshidratación secuencial en etanol graduado y se sumergieron en hexametildisilazano durante 3 minutos para su secado. Las muestras se observaron bajo XL30 SEM (Philips, Países Bajos) por recubrimiento de oro. El análisis de elementos se llevó a cabo utilizando espectrometría de rayos X de energía dispersiva (EDS).

Ejemplo 1: Densidad Molecular De pMHC En La Superficie De Nanopartículas (NP) Frente A La Actividad Biológica De Nanomedicinas Basadas En pMHC

[0281] Para comprender cómo la valencia de los complejos de histocompatibilidad peptídico-principal (pMHC) y la concentración de pMHC-nanopartículas (NP) contribuye a la

actividad biológica de estos compuestos, el solicitante comparó la capacidad de varias preparaciones NRP-V7/Kd-NP con la de forma transitoria activar células T CD8+ afines (NRP-V7/Kd/IGRP206-214 específicas) de ratones transgénicos 8.3-NOD de receptores de células T (TCR). Como se muestra en la Figura 1A, las células T 8.3-CD8+ produjeron pequeñas cantidades de interferón gamma (IFN γ) cuando se cultivaron en presencia de NPs SFP recubiertos con 8 pMHCs/NP, pero cantidades sustancialmente mayores de IFN γ en respuesta a NPs recubiertos con valencias de pMHC más altas, incluso cuando tan bajo como 11 pMHCs/NP, en un amplio rango de concentraciones de pMHC-NP o pMHC. Esta observación sugirió que hay un umbral de valencia de pMHC para la actividad agonista de SFP-NP, que se encuentra entre 9 y 11 pMHC/NP (Figuras 1A y 1B). Sin estar atados a la teoría, los aumentos en las concentraciones de pMHC-NP pueden mejorar las propiedades agonistas de los pMHC-NP que llevan valencias de pMHC de "umbral" o "supraumbral".

[0282] Para confirmar esta observación, el solicitante utilizó a continuación PF-NP, que son más grandes que SFP-NP y, por lo tanto, tienen una mayor capacidad de recubrimiento de pMHC. Los NP de pMHC-PF que llevaban 13 pMHC/NP o menos tenían una actividad biológica muy débil o nula hasta $\sim 8 \times 10^{12}$ NP/mL, en comparación con los NP de PMHC que

mostraban una valencia de pMHC mucho mayor (61 pMHC/NP, Figuras 1C y 1D, y datos no mostrados). Esto respaldaba la idea de que el umbral de pMHC requerido para la actividad agonista aumenta con el tamaño de NP (es decir, de >8 pMHC para ~8 nm SFP-NP a >13 pMHC para ~20 nm PF-NP). Los efectos inversos del tamaño de NP y la valencia de pMHC sobre la actividad agonista sugirieron un papel para la densidad de pMHC (pMHC/área de superficie de NP). Esto se ilustra adicionalmente en Las Figuras 1E y 1F, donde el solicitante comparó la actividad biológica de NPs SFP y PF recubiertos con un número similar de pMHC en un rango de concentraciones de NP o pMHC (para compensar las diferencias absolutas en la "carga" total de pMHC cuando se usan concentraciones idénticas de NP de diferente tamaño).

Ejemplo 2- Aumentos Rápidos En La Actividad Biológica Por Encima De Las Densidades Del Umbral de pMHC

[0283] Estos datos sugieren que el umbral de actividad biológica está definido por una constante que corresponde a la distancia que separa los monómeros de pMHC individuales en el NP. El solicitante comparó las capacidades de unión al umbral máximas y previstas de NP de diferentes tamaños, para identificar un umbral de densidad de pMHC. El umbral teórico de densidad de pMHC está en 0.004468 pMHCs/nm², correspondiente a 11 pMHCs para un NP de 8 nm o 22 pMHC para

un NP de 20 nm. Estos valores corresponden a una distancia intermolecular calculada de ~16.88 nm. Se cree que el complejo receptor de antígeno de células T (TCR) contiene hasta dos heterodímeros $\text{TCR}\alpha\beta$ dentro de un complejo $\text{CD3}\gamma\text{-CD3}\epsilon\text{-TCR}\alpha\beta\text{-CD3}\zeta\text{-CD3}\zeta\text{-TCR}\alpha\beta\text{-CD3}\delta\text{-CD3}\epsilon$ (Rojo, JM ET AL. (1991) Immunol Today 12 (10): 377-378; Fernández-Miguel, G. y otros (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96 (4):1547-1552). Esta estructura es compatible con el ancho estimado del complejo TCR basado en la reconstrucción 3D (12nm) (Arechaga, I. et al. (2010) Int Immunol 22 (11): 897-903), y es consistente con el inter-pMHC calculado distancia de 16,88 nm para alcanzar el umbral agonista. El solicitante calculó la distancia intermolecular mínima posible a ~3.62 nm, lo que es un buen augurio con la distancia estimada de 3-6nm que abarca las TCR individuales dentro de los nano clústers de $\text{TCR}\alpha\beta$; esta distancia permitiría una alineación casi perfecta de pMHC en las NP y TCR afines en las células T (Figura 2A). Los pMHC-NP capaces de ligar heterodímeros de TCR contiguos en estos clústers son eficientes para provocar la señalización de TCR. Estos modelos explican por qué los NP pequeños recubiertos con pMHC estrechamente adheridos tienen propiedades inmunológicas óptimas. La densidad de pMHC controla la conversión de células Treg porque puede promover el ensamblaje sostenido de grandes microclústers de TCR, lo

que conduce a una señalización de TCR rápida, robusta y prolongada (Figura 2B).

[0284] La hipótesis basada en los datos generados usando NP recubiertos con pMHC de clase I se probó comparando la potencia desencadenante de TCR de NP de PF recubiertos con monómeros de pMHC clase II, en una amplia gama de valencias. Las células T CD4⁺ aisladas de ratones NOD transgénicos BDC2.5-TCR produjeron pequeñas cantidades de IFN γ en respuesta a NP de PF-M recubiertos con hasta 22 complejos de pMHC afines (BDC2.5mi/IAg7) (0.0045 pMHCs/nm², Figura 1G). Sorprendentemente, al trazar los datos de secreción de IFN γ obtenidos a 10 y 5 μ g de pMHC/mL (las concentraciones a las que se estabiliza el efecto dosis-respuesta), la magnitud de la secreción de IFN γ aumenta exponencialmente en respuesta a aumentos relativamente pequeños en la valencia de pMHC, comenzando en ~22 pMHCs (la valencia umbral predicha) y terminando en ~32 pMHCs/NP (0.0065 pMHCs/nm², en lo sucesivo denominado "valencia mínima óptima") (Figura 1H). Los aumentos sustanciales en la valencia/densidad de pMHC por encima de esta valencia óptima mínima no dan como resultado una potencia significativamente mayor (Figura 1H).

Ejemplo 3 - La Densidad De 3-pMHC Controla La Magnitud De La Señalización De TCR Inducida Por pMHC-NP

[0285] Para determinar si estos efectos biológicos podrían

explicarse por las diferencias dependientes de la densidad de pMHC en la eficiencia de la señalización de TCR, el solicitante transdujo la línea de células T humanas Jurkat/MA (JurMA) (que carece de expresión de la cadena de TCR β endógena y porta una luciferasa marcador dirigido por el factor nuclear de las secuencias de ADN de unión al factor de transcripción de células T activadas (NFAT) (Scholten, KB et al. (2005) Clin Immunol 114 (2):119-129) con lentivirus que codifican el heterodímero BDC2.5 TCR $\alpha\beta$ y el correceptor CD4 murino. Como se muestra en la Figura 1I, las células BDC2.5-TCR/mCD4-JurMA respondieron rápidamente (dentro de 2 h), enérgicamente y durante un período de tiempo sostenido (>24 h) a PF-M recubierto con BDC2.5mi/IAg7, en comparación con las concentraciones óptimas de un mAb CD3 ϵ anti humano agonista o PMA/ionomicina, que desencadenó una respuesta mucho más lenta que alcanzó su punto máximo a las 14h y luego disminuyó progresivamente. En particular, los experimentos con NP de PF-M recubiertos con una amplia gama de valencias BDC2.5mi/IAg7 indicaron que la magnitud de la expresión de luciferasa (una lectura directa de la señalización de TCR) siguió una cinética notablemente similar a la observada con BDC2.5- primario. Células T CD4+, lo que indica que las densidades umbral y supraumbral de pMHC de alguna manera promueven la señalización cooperativa de TCR (Figura 1J).

[0286] También es inesperado observar el ensayo de esta descripción que presenta una curva sigmoideal (Figura 1J) que imita de cerca la curva de respuesta de densidad de pMHC cuando se usan células T transgénicas TCR primarias ingenuas,

5 ambas en términos de (a) forma consistente con efectos de señalización cooperativa, y (b) las valencias/densidades específicas de pMHC que definen el umbral y las densidades óptimas mínimas. Esto es completamente sorprendente para una línea celular transfectada que sobreexpresa los pares

10 exógenos de TCR/correceptor. Un experto en la materia hubiera esperado respuestas lineales (en oposición a la curva de forma sigmoideal) de las células transfectadas dada la dificultad de igualar el número molecular y la estequiometría precisa de las moléculas TCR murina transfectadas y CD4, y

15 considerando que la línea celular huésped es de origen humano (incluidos sus componentes de la cadena CD3), mientras que las moléculas de pMHC y TCR/CD4 analizadas fueron murinizadas.

Ejemplo 4: Los pMHC-NP Desencadenan La Agrupación De

20 **Receptores De Antígeno En Células T Murinas Afines**

[0287] El solicitante ha demostrado que los pMHC-NP promueven la conversión de células Treg al ligar directamente las TCR en las células T afines, en lugar de entregar los pMHC a estas células T a través de una célula presentadora de

- antígeno (APC) profesional (Clemente-Casares, X et al. (2016) Nature 530 (7591): 434-440). El efecto de densidad de pMHC revelado por los experimentos anteriores, junto con la producción rápida y sostenida de luciferasa impulsada por
- 5** NFAT en células JurMA transfectadas con TCR/mCD4 desafiadas con pMHC-NP en comparación con otros estímulos (Figura 1J), sugirió que pMHC-NPs podría operar induciendo la ligadura prolongada de TCR (en oposición a la naturaleza transitoria de las interacciones pMHC/TCR monoméricas de baja afinidad).
- 10** [0288] Las TCR se organizan, en la superficie de las células T vírgenes, como clústers lineales (Schamel, WW et al. (2013) Immunol Rev 251 (1):13-20) o conjuntos no lineales (Lillemeier, BF et al. (2010) Nat Immunol 11 (1): 90-96) de hasta ~200 nm de diámetro/longitud y compuesto por hasta 30
- 15** TCR (nano clústers) estrechamente asociados (Zhong, L. et al. (2009) PLoS One 4 (6): e5945). Se cree que la arquitectura de nano clústers de estos ensamblajes de TCR aumenta la avidéz física, por lo tanto, la sensibilidad funcional, de las células T para pMHC afines en APC profesionales y promueve la
- 20** señalización intracelular cooperativa entre las unidades de TCR estrechamente opuestas. Existe evidencia de que la formación de nano clústers de TCR es constitutiva y es anterior a la formación de microclústers de TCR (que conduce a una señalización sostenida de TCR) que resulta de la

ligadura de pMHC (que generalmente tiene un tamaño de 300-800 nm y contiene hasta 70 TCR) (Lillemeier, BF et al. (2010) Nat Immunol 11 (1): 90-96; Yokosuka, T. et al. (2005) Nat Immunol 6 (12):1253-1262; Choudhuri, K. et al. (2010) FEBS Lett 584
5 (24): 4823-4831; Sherman, E. et al. (2011) Immunity 35 (5): 705-720).

[0289] Para obtener información sobre el efecto de densidad de pMHC descrito anteriormente, el solicitante investigó la geometría de unión y la cinética de los NP
10 recubiertos con pMHC (a densidades de pMHC supraumbral) para afinar las células T. Los estudios TEM revelaron que los pMHC-NP se unen a las células T CD8+ o CD4+ afines como clústers (islas) de varios NP que abarcan ~100-150 nm (Figuras 3A y 3B). Esta geometría de unión ya se observó
15 dentro de los 30 minutos a 4°C, fue seguida por el crecimiento del racimo (a diámetros/longitudes de ~400 nm) tras la incubación a 37°C (Figuras 3A, 3B y 3G), y culminó en la internalización de los NP en vesículas intracelulares, comenzando a las ~3 h después de la unión (Figuras 3A y 3B).
20 Este clúster en interacción era específico de antígeno ya que no se observó unión ni internalización de NP cuando se incubaron pMHC-NP con células T no relacionadas (Figura 3C). Estos resultados se corroboraron mediante microscopía de

súper resolución (Figura 3D) y microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figuras 4A y 4B), confirmando la presencia de pMHC-NP agrupados en la superficie de las células T afines.

[0290] En conjunto, estos datos sugirieron que los pMHC-NP funcionan como dispositivos de unión a nano clústers y desencadenantes de microclústers de TCR, lo que aumenta la posibilidad de que este proceso sea responsable o al menos contribuya a la conversión de células Treg. Dado que la conversión de Treg es una función directa de la densidad de pMHC, el solicitante investigó si las variaciones en la densidad de pMHC tenían algún efecto sobre la formación de microclústers de TCR. El solicitante comparó las preparaciones de BDC2.5mi-IAg7-NP que transportan pMHC en densidades de subumbral, umbral y supraumbral. Sorprendentemente, los NP recubiertos a densidades por debajo del umbral se unieron y finalmente fueron internalizados por células T CD4+ afines, pero sin formar clústers (Figuras 3E y 3G). Por el contrario, los NP recubiertos a densidades de umbral desencadenaron fácilmente la formación de clústers, y los tamaños de estos clústers aumentaron usando NP recubiertos a densidades superiores al umbral (Figuras 3A, 3F y 3G).

[0291] Los datos anteriores indican que la geometría de unión de las nanomedicinas basadas en pMHC a las células T

afines representa los efectos observados de la densidad de pMHC. Los monómeros de pMHC estrechamente propuestos en la superficie de NP facilitarían la repetición de la interacción de monómeros de pMHC disociados transitoriamente en NP

5 individuales, retrasando así la internalización de TCR y alargando los $t_{1/2}$ s de las interacciones individuales de TCR-pMHC (Zhong, L. et al. (2009) PLoS One 4 (6): e5945; Huppa, JB et al. (2010) Nature 463 (7283): 963-967). Los reordenamientos del citoesqueleto desencadenados por los

10 eventos de señalización resultantes promoverían el ensamblaje sostenido de unidades proximales pMHC-NP-TCR en grandes microclústers TCR (Bunnell, SC et al. (2002) J Cell Biol 158 (7):1263-1275), amplificando además la duración y la magnitud de la señalización de TCR (Yokosuka, T. et al. (2005) Nat

15 Immunol 6 (12):1253-1262). Las altas densidades de pMHC también facilitarían la propagación cooperativa de los cambios conformacionales y los eventos de señalización aguas abajo asociados de las TCR unidos a pMHC a sus vecinos no

20 unidos (Gil, D. et al. (2002) Cell 109 (7): 901-912; Minguet, S et al. (2007) Immunity 26 (1): 43-54), tanto dentro como entre NP individuales en clústers de membranas (Martinez-Martin, N. et al. (2009) Science Signaling 2 (83): ra43). Esta interpretación es compatible tanto con la corrección de pruebas cinética (McKeithan, TW (1995) Proc Natl Acad Sci USA

92 (11): 5042-5046) como con los modelos de compromiso de TCR en serie (Valitutti, S. et al. (1995) Nature 375 (6527):148-151) de activación de células T.

[0292] El descubrimiento de las propiedades de
 5 señalización dependientes de la agrupación del receptor de antígeno y la densidad de pMHC no anticipadas de estos compuestos permite el uso de líneas celulares marcadoras que expresan el receptor de antígeno tales como las descritas aquí o similares en ensayos de potencia y liberación de
 10 lotes.

Ejemplo 5: Protocolo De Ejemplo Para Un Ensayo De Potencia Basado En Luciferasa

[0293] En este ejemplo se detalla un ensayo de potencia de ejemplo para uso en la determinación de la potencia de
 15 cualquier preparación dada de nanopartículas de pMHC. Las células en este caso comprenden un gen de luciferasa bajo el control del promotor NFAT. El CD4 murino se expresa ya que las células JurMA son una línea celular humana, y el componente MHC del pMHC analizado en este ejemplo es el ratón
 20 I-Ag7. Se contempla y se muestra en ejemplos posteriores que la línea celular JurMA funciona tanto con MHC humano como con ratón (dado que las células JurMA muestran expresión endógena de CD4 humano).

1. En una placa de 96 pocillos (por triplicado), agregar 500,000 células JurMA BDC2.5/mCD4+ en 200 μ L de medio de águila modificada de Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich, Cat# D6429-500ML), suplementado con 10% fetal suero bovino (FBS) (Sigma-Aldrich, Cat# F6178) en presencia de: 1) 20 ng/ml de PMA (Sigma-Aldrich, Cat# P8139) más 0.5 μ M de Ionomicina (Sigma-Aldrich, Cat# I3909-1ML), 10 μ g/ml de mAb anti hCD3 ϵ (OKT3, BD Biosciences) (como control positivo); 2) 12.5 o 5.0 μ g/mL o recubierto con pMHC en PF-M NP de diversas valencias que van desde 10-48 pMHCs/NP; o 3) NP recubierto de cisteína (como control negativo que tiene una concentración de hierro equivalente a pMHC-NP). Incubar durante la noche en una incubadora de CO₂ a 37°C con 9% de suministro de CO₂. Como control, replica esta configuración con células JurMA de tipo salvaje.

2. Al día siguiente, centrifugar las células a 1200 rpm 5 minutos y eliminar el medio. Después de esto, agregar 200 μ L de PBS y lave las células 3 veces.

3. Volver a suspender el sedimento celular en 100 μ L de Tampón de lisis 1x (Reactivo de lisis de cultivo celular, Promega, Cat.# E1531) e incubar durante 30 minutos con agitación suave.

4. Sacar 20 μ L del lisado y transferirlo a una placa blanca opaca de 96 pocillos (Greiner Bio-one Ref. # 655075).

5. Agregar 100 μ L de reactivo de ensayo de luciferasa (Promega, Cat.# E1500) por pocillo, luego leerlo inmediatamente usando un luminómetro de microplacas Veritas™ (el inyector de este instrumento agrega automáticamente 100 μ L de reactivo de ensayo de luciferasa por pocillo. La placa se avanza al siguiente pozo para repetir el proceso de inyección-luego-lectura). La luz producida se mide durante un período de 10 segundos (tiempo de integración). El tiempo de retraso es de 2 segundos

10 [0294] Este método es generalmente aplicable a un ensayo de potencia y actividad de muchos tipos diferentes de composiciones de nanopartículas, como se muestra en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 6: Medición De La Variabilidad Entre Ensayos

15 [0295] Para medir la variabilidad entre ensayos, el solicitante preparó pMHC-NP que tienen la misma especificidad (es decir, los mismos complejos de pMHC unidos al núcleo) y analizó SD50 (concentración que produce la mitad de la actividad máxima, medida en un gráfico semilog). Estos

20 experimentos utilizaron células JurMA transfectadas con un TCR recombinante específico para GAD524-543 unido a I-Ag7 (BDC 2.5mi) y un CD4 de ratón recombinante. Los resultados se resumen en la Figura 5 y muestran que los datos actuales con 7 experimentos son 8.91 más/menos 1 microgramo/ml (media

más/menos desviación estándar de la media). La reproducibilidad probada y observada con el ensayo del solicitante es inesperada porque el marcador no es realmente un evento de señalización proximal de TCR, y un experto en la materia esperaría más variabilidad de ensayo a ensayo de la que se muestra. Sin embargo, este cálculo de datos muestra respuestas ajustadas y establece que dicho ensayo cuantitativo es mucho más preferido que los ensayos convencionales, pero menos cuantitativos o semicuantitativos (por ejemplo, mediciones de la intensidad de la fosforilación de intermedios de señalización aguas arriba del marcador de señalización de TCR). La ventaja de la cuantificación, junto con una baja variabilidad interexperimental y una reproducción fiel de los umbrales de densidad de pMHC responsables de la actividad biológica, puede proporcionar una comparación lote a lote excelente y altamente sensible de la composición y calidad de esta divulgación.

Ejemplo 7: Ensayo De Potencia Basado En Células Para Evaluar Los Efectos Potenciales De Los Anticuerpos Anti Navacim Sobre La Función Estimuladora De Células T In Vitro De Navacim

[0296] En el suministro post-in vivo, existe la posibilidad de que un huésped inmunocompetente genere una respuesta humoral contra diversos componentes de pMHC-NP. Estos incluyen etiquetas de purificación de proteínas tales como la

etiqueta His 6x presente dentro de los monómeros de pMHC recubiertos en su superficie, así como PEG, que es un componente estructural del pMHC-NP. Este ejemplo mide si los anticuerpos dirigidos contra los diversos componentes de pMHC-NP (pMHC, PEG, etiqueta His) tienen un efecto apreciable sobre la capacidad de pMHC-NP para captar e inducir la señalización de TCR en las células T. Los resultados anteriores han demostrado la capacidad de la exposición del suero humano a pMHC-NP para bloquear la unión de los anticuerpos anti PEG (AGP4) y anti His (6G2A9) a las partículas. Por lo tanto, este ensayo evaluará las partículas pre expuestas y no expuestas de suero humano para determinar su capacidad de estimular las células T JurMA afines después de la exposición a anticuerpos monoclonales anti His, anti PEG o anti MHC o suero hiperinmune de conejo.

Reactivos Y Diseño Experimental

MAbs Anti pMHC

- mAb MHC Clase II RT1B anti ratón/rata purificado (clon OX-6) (1 mg/ml en PBS, Catálogo Bio-Rad # MCA46R) mAb anti PEG purificado (clon AGP4) (1.4 mg/mL en PBS, Anti PEG, Cat# AGP4-PABM-A).
- mAb de etiqueta anti His purificada (clon 6G2A9) (0.5 mg/mL en PBS, Genscript, Cat# A00186).

- IgG de ratón purificado (clon MOPC21) (0.5 mg/mL en PBS, BD Biosciences Cat# 554121).

Suero

- Suero de conejo hiperinmune anti PEG.
- 5 • Suero de conejo hiperinmune pMHC anti BDC2.5mi.
- Suero de conejo pre inmune.
- Suero humano (Sigma, Cat # H4522)

pMHC-NPs

- BDC2.5mi-PFM-112017 (Fe: 2.15 mg/mL, pMHC: 0.97
- 10 mg/mL, Valencia 42 pMHC/NP)
- Cys-PFM-111417 (Fe:1.52 mg/ml)

Método De Detección De Luciferasa:

- Kit de ensayo de luciferasa Promega firefly con tampón de lisis de cultivo celular (Promega Cat# E1500).
- 15 • Luminómetro de lectura de placa Spectramax i3x con inyector de reactivo.

El ensayo de potencia se realizó siguiendo el protocolo del Ejemplo 5-Ejemplo para un ensayo de potencia basado en luciferasa).

20 Resultados

[0297] Con o sin exposición previa al suero humano, como se esperaba, el mAb o antisuero dirigido contra anti MHC-II (anti BDC2.5mi/IAg7) pudieron inhibir notablemente la actividad de Navacim en el ensayo de potencia in vitro en un

título dependiente del título conducta. Estos tratamientos se incluyeron como controles de inhibición positiva para ayudar a validar el ensayo. Como se muestra en las Figuras 6A a 6D, no se observó inhibición de la actividad de pMHC-NP con los marcadores anti His, mAbs anti PEG o sueros hiperinmunes anti PEG de conejo en comparación con los controles negativos (IgG de ratón o suero pre inmune de conejo), con o sin pre exposición a suero humano. En ausencia de suero humano, los mAbs anti PEG pre exposición en realidad mostraron un fuerte efecto potenciador sobre la estimulación de linfocitos T pMHC-NP (posiblemente debido a la reticulación por la estructura pentamérica del complejo pMHC-NP, ya que esto no es visto con suero hiperinmune anti PEG). Este efecto fue bloqueado por la exposición previa de Navacim al suero humano, de acuerdo con nuestros hallazgos anteriores de que la exposición al suero bloqueó la unión del anticuerpo anti PEG. Por lo tanto, la exposición de Navacim al suero humano no reduce su potencia en el ensayo JurMA.

Ejemplo 8: Los Heterodímeros pMHC IGRP13-25/DR3 Se Unen A Líneas Celulares Diseñadas Que Expresan TCR Afines

[0298] Se probó la capacidad de los heterodímeros de pMHC-DR3 IGRP13-25 sin cierre, con cierre y sin cierre de cys, para unir un receptor de células T. Para esto, se usó una línea celular reportera que expresaba la cadena alfa y beta

de un receptor de células T humano específico para IGRP13-25 pMHC-DR3.

Protocolo De Transducción De La Línea Celular JURMA-hCD4 Con

5 Retrovirus Que Codifican IGRP-TCR

- [0299] **Generación De La Línea Celular Empaquetadora GP+envAm12**. Se transfectaron células 293T con un retrovirus que expresa IGRP-TCR y un marcador GFP, junto con construcciones de empaquetamiento gag/pol y VSV. Tres días
- 10** después de que los sobrenadantes enriquecidos seudotipados con VSV se cosecharon, se dividieron en alícuotas y se congelaron. Estas alícuotas se usaron para transducir la línea celular de empaquetamiento anfotrófica GP+envAm12 (ATCC CRL-9641) mediante infección por rotación (2700 rpm 1 h).
- 15** Después de 5 infecciones por centrifugado, GP+envAm12 transducido se clasificaron para la expresión de GFP si fuera necesario.

Transducción De La Línea Celular JURMA-hCD4 Con Retrovirus Que Codifican IGRP-TCR

- 20** [0300] Se colocaron en placa tres millones de GP+envAm12 transducidos y clasificados por pocillo de una placa de 6 pocillos en un volumen final de 3 ml. Al día siguiente, 100,000 JURMA-hCD4 se cultivaron conjuntamente con GP+envAm12 transducido previamente enchapado en un volumen final de 3 ml

suplementado con 8 µg/ml de polibreno. Este cocultivo se mantuvo durante dos semanas cambiando los medios cada 2 o 3 días. Después del cocultivo, se recolectaron células JURMA-hCD4 analizadas por citometría de flujo y clasificadas para una alta expresión transgénica. Las células se tiñeron luego con heterodímeros marcados con PE. FIGURA 7A representa las células no teñidas como un control negativo, la Figura 7D representa células teñidas con tetrámero irrelevante, la Figura 7B representa la tinción con tetrámeros hechos de heterodímeros expresados usando tecnología cys-trap y cierre de leucina. La Figura 7C representa tetrámeros hechos de heterodímeros expresados usando tecnología cys, trap y botón en ojal, sin un cierre de leucina. La tinción entre heterodímeros realizados con cualquiera de las tecnologías fue robusta. Estos datos demuestran que los heterodímeros fabricados con una tecnología de ojal de cierre atrapado en cys sin cierre pueden unir el receptor de células T.

Ejemplo 9: Los Heterodímeros De pMHC Con Botón En Ojal IGRP13-25/DR3 Estimulan Las Líneas Celulares Marcadoras In Vitro

[0301] La capacidad de los heterodímeros estabilizados con botón en ojal atrapados en cys cuando se unen a nanopartículas de óxido de hierro para estimular la señalización de células T se probó usando células JurMA que

expresan un TCR IGRP13-25 humano y luciferasa bajo el control del promotor NFAT. Estos resultados mostrados en la Figura 8A y la Figura 8B indican que los heterodímeros estabilizados con botón en ojal atrapados en cys, cuando se unen a nanopartículas de óxido de hierro, son capaces de inducir la señalización de células T.

[0302] Debe entenderse que, aunque la presente divulgación ha sido revelada específicamente por ciertas realizaciones y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a la modificación, mejora y variación de las divulgaciones aquí descritas, y que tales modificaciones, Se considera que las mejoras y variaciones están dentro del alcance de esta divulgación. Los materiales, métodos y ejemplos proporcionados aquí son representativos de ciertas realizaciones, son ejemplares y no pretenden ser limitaciones del alcance de la divulgación.

[0303] La divulgación se ha descrito de manera amplia y genérica en este documento. Cada una de las especies más estrechas y clústers subgenéricos que caen dentro de la divulgación genérica también forman parte de la divulgación. Esto incluye la descripción genérica de la divulgación con una condición o limitación negativa que elimina cualquier tema del género, independientemente de si el material extirpado se menciona específicamente aquí o no.

[0304] Además, cuando las características o aspectos de la divulgación se describen en términos de clústers Markush, los expertos en la materia reconocerán que la divulgación también se describe en términos de cualquier miembro
5 individual o subclúster de miembros del clúster Markush.

[0305] El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "o" a menos que se indique explícitamente que se refieren solo a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda
10 una definición que se refiere solo a alternativas y "O".

[0306] Como se usa en esta especificación y en la (s) reivindicación (es), las palabras "que comprende" (y cualquier forma de comprender, como "comprende" y "comprende"), "tener" (y cualquier forma de tener, como
15 "tener" y "tiene"), "incluir"(y cualquier forma de incluir, como "incluye" e "incluir ") o "contener"(y cualquier forma de contener, como "contiene" y "contener") son inclusivas o abiertas y no excluyen elementos adicionales no recitados o pasos del método.

20 [0307] A lo largo de esta divulgación, se hace referencia a varias publicaciones, patentes y especificaciones de patentes publicadas mediante una cita de identificación. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en este

documento se incorporan expresamente como referencia en su totalidad, en la misma medida que si cada una se incorporara como referencia individualmente. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluidas las

5 definiciones.

Listado De Secuencias Ejemplar

Tabla 3 - Secuencias De Salto De Ribosomas

Fuente		Secuencia	SEQ ID NO:
Picornavir us	EMC-B -119aa	GIFNAHYAGYFADLLIHDIETNPG	456
	EMC-D	GIFNAHYAGYFADLLIHDIETNPGP	457
	EMC-PV21	RIFNAHYAGYFADLLIHDIETNPGP	458
	MENGO	HVFETIAGYFSDLLIHDVETNPGP	459
	TME-GD7 - 109aa-	KAVRGYHADYYKQRLIHDVEMNPGP	460
	TME-DA	RAVRAYHADYYKQRLIHDVEMNPGP	461
	TME-BEAN	KAVRGYHADYYRQRLIHDVETNPGP	462
	Virus similar al de Theiler	KHVREYHAAYYKQRLMHDVETNPGP	463
	Virus Ljungan (174F)	MHSDEMDFAGGKFLNQCGDVETNPGP	464
	Virus Ljungan (145SL)	MHNDEMDYSGGKFLNQCGDVESNPGP	465
	Virus Ljungan (87- 012)	MHSDEMDFAGGKFLNQCGDVETNPGP	466
	Virus Ljungan (M1 146)	YHDKDMDYAGGKFLNQCGDVETNPGP	467
	FMD-A10	LLNFDLLKLAGDVESNPGP	468
	FMD-A12	LLNFDLLKLAGDVESNPGP	469
	FMD-C1	LLNFDLLKLAGDVESNPGP	470
	FMD-OIG	LLNFDLLKLAGDMESNPGP	471
	FMD-OIK	LTNFDLLKLAGDVESNPGP	472
	FMD-0 (Taiwán)	LLNFDLLKLAGDVESNPGP	473
	FMD-O/SK	LLSFDLLKLAGDVESNPGP	474
	FMD-SAT3	MCNFDLLKLAGDVESNPGP	475
	FMD-SAT2	LLNFDLLKLAGDVESNPGP	476
	ERAV	CTNYSLLKLAGDVESNPGP	477

	ERBV	GATNFSLLKLAGDVELNPGP	478
	ERV-3	GATNFDLLKLAGDVESNPGP	479
	PTV-1	GPGATNFSLLKQAGDVEENPGP	480
	PTV-2	GPGATNFSLLKQAGDVEENPGP	481
	PTV-3	GPGASSFSLLKQAGDVEENPGP	482
	PTV-4	GPGASNFSLLKQAGDVEENPGP	483
	PTV-5	GPGAANFSLLRQAGDVEENPGP	484
	PTV-6	GPGATNFSLLKQAGDVEENPGP	485
	PTV-7	GPGATNFSLLKQAGDVEENPGP	486
	PTV-8	GPGATNFSLLKQAGDIEENPGP	487
	PTV-9	GPGATNFSLLKQAGDVEENPGP	488
	PTV-10	GPGATNFSLLKQAGDVEENPGP	489
	PTV-11	GPGATNFSLLKRAGDVEENPGP	490
Virus de Insecto	CrPV	FLRKRTQLMSGDVESNPGP	491
	DCV	EAARQMLLLLSGDVETNPGP	492
	ABPV	GSWTDILLLLSGDVETNPGP	493
	ABPV aislado Polonia 1	GSWTDILLLLSGDVETNPGP	494
	ABPV aislado Hungría 1	GSWTDILLLWSGDVETNPGP	495
	IFV	TRAEIEDELIRAGIESNPGP	496
	TaV	RAEGRGSLLTCGDVEENPGP	497
	EEV	QGAGRGSIVTCGDVEENPGP	498
	APV	NYPMPALQKIIDLIESNPPP	499
	KBV	GTWESVLNLLAGDIELNPGP	500
	PnPV (a)	AQGWPDLTVDGDVESNPGP	501
	PnPV (b)	IGGGQKDLTQGDIESNPGP	502
Ectropis obliqua picorna-like virus	(a)	AQGWAPDLTQGDVESNPGP	503
	(b)	IGGGQORDLTQGDIESNPGP	504
Providencia virus	(a)	VGDRGSLLTCGDVESNPGP	505
	(b)	SGGRGSLLTAGDVEKNPGP	506
	(c)	GDPIEDLTDDGDIEKNPGP	507
Rotavirus Tipo C	Rotavirus Bovino	SKFQIDRILISGDIELNPGP	508
	Rotavirus Porcino	AKFQIDKILISGDVELNPGP	509
	Human Rotavirus	SKFQIDKILISGDIELNPGP	510
Reovirus (cypovirus 1)	Bombyx mori	FRSNYDLLKLCGDIESNPGP	511
	Lymantria dispar	FRSNYDLLKLCGDVESNPGP	512

	Dendrolimus punctatus	FRSNYDLLKLCGDVESNPGP	513
Secuencias Repetidas de Tr pansoma spp.	T. brucei TSR1	SSIIRTKMLVSGDVEENPGP	514
	(CAB95325.1)	SSIIRTKMLLSGDVEENPGP	515
	(CAB95342.1)	SSIIRTKMLLSGDVEENPGP	516
	(CAB95559.1)	SSIIRTKILLSGDVEENPGP	517
	T. cruzi AP Endonucleasa	CDAQRQKLLLSGDIEQNPGP	518
Secuencias Procarióticas	T. marítima aguA	YIPDFGGFLVKADSEFNPGPX	519
	B. bronchiseptica	VHCAGRGGPVRLLDKEGNPGP	520
Secuencias Eucarióticas (celular)	Ratón mor-1F	DLELETVGSHQADAETNPGPX	521
Secuencias Eucarióticas (celular)	D. melanogaster mod (mdg4)	TAADKIQGSWKMDTEGNPGPX	522
	A. nidulans Ca channel MIDI	PITNRPRNSGLIDTEINPGP	523

Tabla 4 - Secuencias IRES

Fuente	Secuencia	SEQ ID NO:
Secuencia EMCV IRES	CCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGG CCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTT TGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTC TTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCC TGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTC CCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAA TGTGCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTC TTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTG CAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTG CCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATAC ACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGT TGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATG GCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAA GGATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATC TGATCTGGGGCCTCGGTACACATGCTTTACATG TGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCC CCCGAACCACGGGGACGTGGTTCCTTTGAAA AACACGATGATAATATGGCCAC	524

Secuencia pBag1 IRES	CTGGGCGGTCAACAAGTGCGGGCCTGGCTCAGC GCGGGGGGCGCGGAGACCGCGAGGCGACCGGG AGCGGCTGGGTTCCTGGCTGCGCGCCCTTCGGC CAGGCCGGGAGCCGCGCCAGTCGGAGCCCCCGG CCCAGCGTGGTCCGCCTCCCTCTGGGCGTCCAC CTGCCCCGAGTACTGCCAGCGGGCATGACCGAC CCACCAGGGGCGCCGCCGCGCGCTCGCAGGC CGCGGATGAAGAAGAAAACCCGGCGCCGCTCGA CCCGGAGCGAGGAGTTGACCCGGAGCGAGGAGT TGACCCTGAGTGAGGAAGCGACCTGGAGTGAAG AGGCGACCCAGAGTGAGGAGGCGACCCAGGGCG AAG	525
Secuencia IRES Sintética	AAAAGAAGGAAAAAGAAGGAAAAAGAAGAAAA GAAGGCTGCAGGCGGCTGCAGAAAAGAAGGAAA AAGAAGGAAA AGAAGGAAAA AGAAGG	526

Tabla 5. Secuencias De Polipéptidos Y Polinucleótidos

Notas	Secuencia	SEQ ID NO:
TCR IGRP	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISIL NCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISISSIKDKNEDGRFTVFLNK SAKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAATNSGGSNYKLTFGKGTLTVPNP IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKT VLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSC DVKLVEKSFETDTNLFQNLQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSG SGATNFSLLKQAGDVEENPGPMSNQVLCVLCFLGANTVDGGITQS PKYLFRKEGQNVTLSCQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVND FQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASGGRVYQPQ HFGDGTRLSILEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF FPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVS ATFWQNPARNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD CGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMLAMVKRKDF	527
TCRa IGRP	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISIL NCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISISSIKDKNEDGRFTVFLNK SAKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAATNSGGSNYKLTFGKGTLTVPNP IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKT VLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSC DVKLVEKSFETDTNLFQNLQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	528
TCRb IGRP	MSNQVLCVLCFLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCQNLN HDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESFP LTVTSAQKNPTAFYLCASGGRVYQPQHFGDGTRLSILEDLNKVFPPE VAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVS TDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPARNHFRQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEI LLGKATLYAVLVSAVLMLAMVKRKDF	529

Sin Señal de TCRα IGRP	DQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFL ISISSIKDKNEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAATN SGGSNYKLTFGKGTLLTVNPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTD FDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACA NAFNNSIIPEDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIGFR ILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	530
Sin Señal de TCRβ IGRP	DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIY YSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASG GRVYQPQHFGDGTRL SILEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATL VCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCL SSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSA EAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALV LMA MVKRKDF	531
Secuencia de polinucleótidos de TCR IGRP	ATGGCCATGCTCCTGGGGGCATCAGTGCTGATTCTGTGGCTTCAGCC AGACTGGGTAAACAGTCAACAGAAGAATGATGACCAGCAAGTTAAGC AAAATTCACCATCCCTGAGCGTCCAGGAAGGAAGAATTTCTATTCTG AACTGTGACTATACTAACAGCATGTTTGATTATTTCTATGGTACAA AAAATACCCTGCTGAAGGTCCTACATTCTGATATCTATAAGTTCCA TTAAGGATAAAAATGAAGATGGAAGATTCACTGTCTTCTTAAACAAA AGTGCCAAGCACCTCTCTCTGCACATTGTGCCCTCCCAGCCTGGAGA CTCTGCAGTGTACTTCTGTGCAGCAACAAATAGTGGAGGTAGCAACT ATAAACTGACATTTGGAAGGAAGTCTCTTAACCGTGAATCCAAAT ATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATC CAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTACCGATTTTGATTCTCAAACAA ATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAC GTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGC CTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACA GCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGAAAGTTCTGT GATGTCAAGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAACCTAAA CTTTCAAACCTGTCAAGTATTGGGTTCCGAATCCTCCTCCTGAAAG TGGCCGGGTTTAATCTGCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGCGGC TCCGGAGCCACGAACCTCTCTCTGTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGA AGAAAACCCCGGTCCCATGAGCAACCAGGTGCTCTGCTGTGTGGTCC TTTGTTTCTCTGGGAGCAAACACCGTGGATGGTGGGAATCACTCAGTCC CCAAAGTACCTGTTTCAGAAAGGAAGGACAGAATGTGACCCTGAGTTG TGAACAGAATTTGAACCACGATGCCATGTACTGGTACCGACAGGACC CAGGGCAAGGGCTGAGATTGATCTACTACTCACAGATAGTAAATGAC TTTCAGAAAGGAGATATAGCTGAAGGGTACAGCGTCTCTCGGGAGAA GAAGGAATCCTTTCTCTCACTGTGACATCGGCCCCAAAAGAACCCGA CAGCTTTCTATCTCTGTGCCAGTGGGGGACGGGTCTATCAGCCCCAG CATTTTGGTGATGGGACTCGACTCTCCATCCTAGAGGACCTGAACAA GGTGTTCCCACCCGAGGTGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGA TCTCCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTC TTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGT GCACAGTGGGGTCAGCACGGACCCGCAGCCCCTCAAGGAGCAGCCCG CCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCG GCCACCTTCTGGCAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCA GTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGA	532

Polipéptido murinizado de TCR IGRP	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISISSIKDKNEDGRFTVFLNKSAKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAATNSGGSNYKLTFGKGTLLTVNPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNL SVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMSNQVLCVVLFCFLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASGGRVYQPQHFGDGTRLSILEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRQCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKKRNS	533
TCRa IGRP murinizado	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISISSIKDKNEDGRFTVFLNKSAKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAATNSGGSNYKLTFGKGTLLTVNPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNL SVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	534
TCRb IGRP murinizado	MSNQVLCVVLFCFLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASGGRVYQPQHFGDGTRLSILEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRQCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKKRNS	535
Sin señal de TCRa IGRP murinizado	DQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISISSIKDKNEDGRFTVFLNKSAKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAATNSGGSNYKLTFGKGTLLTVNPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNL SVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	536
Sin señal de TCRb IGRP murinizado	DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASGGRVYQPQHFGDGTRLSILEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRQCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKKRNS	537

Polipéptido TCR PPI	METLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIQEGENATMNCSYKT SINNLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSSL LITASRAADTASYFCATGRMDSSYKLIFGSGTRLLVLRPDIONPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSM DFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKS FETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSGSGATNFSL LKQAGDVEENPGPMDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEM GQEVTLRCKPISGHNSLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPE DRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSEQLSGNTIYFGE GSWLTVVEDLNKVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDH VELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFW QNPARNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVQTQIVSAEAWGRADCG FTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDF	538
TCRa PPI	METLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIQEGENATMNCSYKT SINNLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSSL LITASRAADTASYFCATGRMDSSYKLIFGSGTRLLVLRPDIONPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSM DFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKS FETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	539
TCRb PPI	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISG HNSLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFS TLKIQPSEPRDSAVYFCASSEQLSGNTIYFGE GSWLTVVEDLNKVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDH VELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFW QNPARNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVQTQIVSAEAWGRADCG FTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDF	540
Sin señal de TCRa PPI	QQGEEDPQALSIQEGENATMNCSYKTSINNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSSL LITASRAADTASYFCATGRMDSSYKLIFGSGTRLLVLRPDIONPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSM DFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKS FETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	541
Sin señal de TCRb PPI	GVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHNSLFWYRQTMMRGLELLIYF NNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSE QLSGNTIYFGE GSWLTVVEDLNKVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDH VELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFW QNPARNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVQTQIVSAEAWGRADCG FTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDF	542

TCR BdC2.5	MHSLHVS LVFLWLQLGGVSSQEKVQQSPESLTVPEGAMASLNCTISD SASQSIWWYQQNPGKGPKALISIFSNGNKKEGRLTVYLNRA SLHVS L HIRDSHPSDSAVYLCAASLAGSWQLIFGSGTQLTVMPDIQNPEPAVY QLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDS KSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDM NLNFQNL SVMGLRILLLLKVAGFNLLMTLRLWSSATNFSLLKQAGDVE ENPGPMGSI FL SCLAVCLLVAGPVPDKIIQKPKYLVAVTGSEKILIC EQYLGHNAMYWYRQSAKKPLEFMFSYSYQKLMNDQTASSRFQ PQSSK KNHLDLQITALKPDDSATYFCASSQGGTTNSDYTFGSGTRLLVIEDL RNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELS W W V N G K EVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFR C Q V Q F H GLSEEDKWPEGSPKPV T Q N I S A E A W G R A D C G I T S A S Y H Q G V L S A T I L YEILLGKATLYAVLVSGLVLMAMVKRKNS	543
TCRa BdC2.5	MHSLHVS LVFLWLQLGGVSSQEKVQQSPESLTVPEGAMASLNCTISD SASQSIWWYQQNPGKGPKALISIFSNGNKKEGRLTVYLNRA SLHVS L HIRDSHPSDSAVYLCAASLAGSWQLIFGSGTQLTVMPDIQNPEPAVY QLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDS KSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDM NLNFQNL SVMGLRILLLLKVAGFNLLMTLRLWSS	544
TCRb BdC2.5	MGSIFLSCLAVCLLVAGPVPDKIIQKPKYLVAVTGSEKILICEQYLG HNAMYWYRQSAKKPLEFMFSYSYQKLMNDQTASSRFQ PQSSKKNHLD LQITALKPDDSATYFCASSQGGTTNSDYTFGSGTRLLVIEDLRNVTP PKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELS W W V N G K E V H S G VSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFR C Q V Q F H G L S E E DKWPEGSPKPV T Q N I S A E A W G R A D C G I T S A S Y H Q G V L S A T I L Y E I L L GKATLYAVLVSGLVLMAMVKRKNS	545
Sin señal TCRa BdC2.5	QSPESLTVPEGAMASLNCTISDSASQSIWWYQQNPGKGPKALISIFS NGNKKEGRLTVYLNRA SLHVS L H I R D S H P S D S A V Y L C A A S L A G S W Q L IFGSGTQLTVMPDIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVP KTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNA TYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNL SVMGLRILLLLKVAGFNLL MTLRLWSS	546
Sin señal TCRb BdC2.5	KIIQKPKYLVAVTGSEKILICEQYLGHNAMYWYRQSAKKPLEFMFSY SYQKLMNDQTASSRFQ PQSSKKNHLDLQITALKPDDSATYFCASSQG GTTNSDYTFGSGTRLLVIEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATL VCLARGFFPDHVELS W W V N G K E V H S G V S T D P Q A Y K E S N Y S Y C L S S R L RVSATFWHNPRNHFR C Q V Q F H G L S E E D K W P E G S P K P V T Q N I S A E A W G RADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSGLVLMAMVKR KNS	547

Secuencia de polinucleótidos de TCRalfa_P2A-TCRbeta - BDC2.5m i	ATGCATTCCCTTACATGTTTCACTAGTGTTCCCTCTGGCTTCAACTAGG TGGGGTGAGCAGCCAGGAGAAGGTACAGCAGAGCCCAGAATCTCTCA CAGTCCCAGAGGGAGCCATGGCCTCCCTCAACTGCACTATCAGCGAC AGTGCTTCTCAGTCCATCTGGTGGTACCAACAGAATCCTGGGAAAGG CCCCAAAGCACTAATATCCATATTCTCTAATGGCAACAAGAAAGAAG GCAGATTGACAGTTTACCTCAATAGAGCCAGCCTGCATGTTTCCCTG CACATCAGAGACTCCCATCCCACTGACTCCGCCGTCTACCTCTGTGC AGCGAGCCTTGCGGGCAGCTGGCAACTCATCTTTGGATCTGGAACCC AACTGACAGTTATGCCTGACATCCAGAACCAGAACCTGCTGTGTAC CAGTTAAAAGATCCTCGGTCTCAGGACAGCACCCCTCTGCCTGTTTAC CGACTTTGACTCCCAAAATCAATGTGCCGAAAACCATGGAATCTGGAA CGTTCATCACTGACAAAACGTGTGCTGGACATGAAAGCTATGGATTCC AAGAGCAATGGGGCCATTGCCTGGAGCAACCAGACAAGCTTCACCTG CCAAGATATCTTCAAAGAGACCAACGCCACCTACCCCAGTTCAGACG TTCCCTGTGATGCCACGTTGACCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATATG AACCTAAACTTTCAAACCTGTCTAGTTATGGGACTCCGAATCCTCCT GCTGAAAGTAGCCGGATTTAACCTGCTCATGACGCTGAGGCTGTGGT CCAGTGCCACGAACCTTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAA GAAAACCCCGGTCCCATGGGCTCCATTTTCTCAGTTGCCTGGCCGT TTGTCTCCTGGTGGCAGGTCCAGTCGACCCGAAAATTATCCAGAAAC CAAAATATCTGGTGGCAGTCACAGGGAGCGAAAAAATCCTGATATGC GAACAGTATCTAGGCCACAATGCTATGTATTGGTATAGACAAAAGTGC TAAGAAGCCTCTAGAGTTTATGTTTTCTACAGCTATCAAAAACTTA TGGACAATCAGACTGCCTCAAGTCGCTTCCAACCTCAAAGTTCAAAG AAAAACCATTTAGACCTTCAGATCACAGCTCTAAAGCCTGATGACTC GGCCACATACTTCTGTGCCAGCAGCCAAGGGGGGACAACAAACTCCG ACTACACCTTCGGCTCAGGGACCAGGCTTTTGGTAATAGAGGATCTG AGAAATGTGACTCCACCCAAGGTCTCCTTGTTTGAGCCATCAAAAGC AGAGATTGCAAACAAACAAAAGGCTACCCTCGTGTGCTTGGCCAGGG GCTTCTTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGCAAG GAGGTCCACAGTGGGGTCAGCACGGACCCCTCAGGCCTACAAGGAGAG CAATTATAGCTACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCTGCTACCT TCTGGCACAATCCTCGCAACCACTTCGCTGCCAAGTGCAGTTCCAT GGGCTTTCAGAGGAGGACAAGTGGCCAGAGGGCTCACCCAAACCTGT CACACAGAACATCAGTGCAGAGGCCTGGGGCCGAGCAGACTGTGGAA TCACTTCAGCATCCTATCATCAGGGGGTTCTGTCTGCAACCATCCTC TATGAGATCCTACTGGGAAGGCCACCCTATATGCTGTGCTGGTCAG TGGCCTGGTGTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAAAATTCCTGA	548
Secuencia de polipéptidos de CD4 Humano	MNRGVFPFRHLLLVQLALLPAATQGKKVVLGKKGDTVELTCTASQKK SIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTGKPSKLNDRADSRRLWDQGNFPL IIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSNGTHLLQGQSLTL TLESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLVSQLELQDSGTWTCTVLQ NQKKVEFKIDIVVLAFAQASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGS GELWWQAERASSSKSWITFDLKNKEVSVKRVTDPKLQMGKKLPLHL TLPQALPQYAGSGNLTALAEAKTGKLHQEVNLVVMRATQLQKNLTCE VWGPTSPKLMLSLKLENKEAKVSKREKAVVVLNPEAGMWQCLLSDSG QVLLESNIKVLPTWSTPVQPMALIVLGGVAGLLLLFIGLGIFFCVRRCR HRRRQAERMSQIKRLLSEKKTQCQPHRFQKTCSPI	549

Secuencia Polinucleótido de CD4 Humano	ATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACT GGCGCTCCTCCCAGCAGCCACTCAGGGAAAAGAAAGTGGTGCTGGGCA AAAAAGGGGATACAGTGGAAGTACCTGTACAGCTTCCCAGAAGAAG AGCATACAATTCCACTGGAAAACTCCAACCAGATAAAGATTCTGGG AAATCAGGGCTCCTTCTTAAGTAAAGGTCCATCCAAGCTGAATGATC GCGCTGACTCAAGAAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAACTTTCCCCTG ATCATCAAGAATCTTAAGATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGA AGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAATTGCTAGTGTTCCGATTGA CTGCCAACTCTGGTACCCACCTGCTTCAGGGGCAGAGCCTGACCCCTG ACCTTGGAGAGCCCCCTGGTAGTAGCCCCCTCAGTGCAATGTAGGAG TCCAAGGGGTAAAAACATACAGGGGGGGAAGACCCTCTCCGTGTCTC AGCTGGAGCTCCAGGATAGTGGCACCTGGACGTGCACTGTCTTGCAG AACCAGAAGAAGGTGGAGTTCAAAATAGACATCGTGGTGCTAGCTTT CCAGAAGGCCTCCAGCATAGTCTATAAGAAAGAGGGGGAACAGGTGG AGTTCTCCTTCCCCTCGCCTTTACAGTTGAAAAGCTGACGGGCAGT GGCGAGCTGTGGTGGCAGGCGGAGAGGGCTTCCTCCTCCAAGTCTTG GATCACCTTTGACCTGAAGAACAAGGAAGTGTCTGTAAAACGGGTTA CCCAGGACCCTAAGCTCCAGATGGGCAAGAAGCTCCCCTCCACCTC ACCTTGCCCCAGGCCTTGCCCTCAGTATGCTGGCTCTGGAAACCTCAC CCTGGCCCTTGAAGCGAAAACAGGAAAGTTGCATCAGGAAGTGAACC TGGTGGTGATGAGAGCCACTCAGCTCCAGAAAAATTTGACCTGTGAG GTGTGGGGACCCACCTCCCCTAAGCTGATGCTGAGCTTGAACTGGA GAACAAGGAGGCAAGGTCTCGAAGCGGGAGAAGGCGGTGTGGGTGC TGAACCCTGAGGCGGGGATGTGGCAGTGTCTGCTGAGTGACTCGGGA CAGGTCCTGCTGGAATCCAACATCAAGGTTCTGCCCACATGGTCCAC CCCGGTGCAGCCAATGGCCCTGATTGTGCTGGGGGGCGTCGCCGGCC TCCTGCTTTTTCATTGGGCTAGGCATCTTCTTCTGTGTGTCAGGTGCCGG CACCGAAGGCGCCAAGCAGAGCGGATGTCTCAGATCAAGAGACTCCT CAGTGAGAAGAAGACCTGCCAGTGCCCTCACCAGTTTTCAGAAGACAT GTAGCCCCATTTGAGTCGACAAGGGCGAATTAATTCAGATCTTACGT AGCTAGCGGATCCCAATTGCTCGAGCGGGATCAATTCCGCCCCCCCC CTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTT GTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAG GGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTC TTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAG GAAGCAGTTCCTCTGG	550
Secuencia Péptida CD4 de Ratón	MCRAISLRRLLLLLLLQLSOLLAVTQGKTLVLGKEGESAELPCESSQK KITVFTWKFSQDKILGQHGKGVLRGGSPSQFDRFDSKKGAWKGS FPLIINKLMEDSQTYICELENRKEEVELWVFKVTFSPGTSLLQGQS LTLTLDNSKVSNNPLTECKHKKGKVVSGSKVLSMSNLRVQDSDFWNC TVTLDQKKNWFGMTLSVLGFQSTAITAYKSEGESAEFSFPLNFAEEN GWGELMWKAEKDSFFQPWISFSIKNKEVSVQKSTKDLKLQKETLPL TLKIPQVSLQFAGSGNLTLTLDKGTLHQEVNLVVMKVAQLNNTLTCE VMGPTSPKMRLTLKQENQEARVSEEQKVQVQVAPETGLWQCLLSEGD KVKMDSRIQVLSRGVNQTVFLACVLGGSFGLGFLGLCILCCVRCRH QQRQAARMSQIKRLLSEKKTQCQPHRMQKSHNLI	551

Secuencia de polinucleótidos CD4 de Ratón	ATGTGCCGAGCCATCTCTCTTAGGCGCTTGCTGCTGCTGCTGCTGCA GCTGTCACAACCTCCTAGCTGTCACTCAAGGGAAGACGCTGGTGCTGG GGAAGGAAGGGGAATCAGCAGAACTGCCCTGCGAGAGTTCCCAGAAG AAGATCACAGTCTTCACCTGGAAGTTCTCTGACCAGAGGAAGATTCT GGGGCAGCATGGCAAAGGTGTATTAATTAGAGGAGGTTTCGCCTTCGC AGTTTGATCGTTTTGATTCCAAAAAAGGGGCATGGGAGAAAGGATCG TTTCTCTCATCATCAATAAACTTAAGATGGAAGACTCTCAGACTTA TATCTGTGAGCTGGAGAACAGGAAAGAGGAGGTGGAGTTGTGGGTGT TCAAAGTGACCTTCAGTCCGGGTACCAGCCTGTTGCAAGGGCAGAGC CTGACCCTGACCTTGGATAGCAACTCTAAGGTCTCTAACCCTTGAC AGAGTGCAAACACAAAAAGGGTAAAGTTGTCAGTGGTTCCAAAGTTC TCTCCATGTCCAACCTAAGGGTTCAGGACAGCGACTTCTGGAAGTGC ACCGTGACCCTGGACCAGAAAAAGAACTGGTTCGGCATGACACTCTC AGTGCTGGGTTTTTCAGAGCACAGCTATCACGGCCTATAAGAGTGAGG GAGAGTCAGCGGAGTTCTCCTTCCCACTCAACTTTGCAGAGGAAAAC GGGTGGGGAGAGCTGATGTGGAAGGCAGAGAAGGATTCTTTCTTCCA GCCCTGGATCTCCTTCTCCATAAAGAACAAAGAGGTGTCCGTACAAA AGTCCACCAAAGACCTCAAGCTCCAGCTGAAGGAAACGCTCCCCTC ACCTCAAGATACCCAGGTCTCGCTTCAGTTTGCTGGTTCTGGCAA CCTGACTCTGACTCTGGACAAAGGGACACTGCATCAGGAAGTGAACC TGGTGGTGATGAAAGTGGCTCAGCTCAACAATACTTTGACCTGTGAG GTGATGGGACCTACCTCTCCCAAGATGAGACTGACCCTGAAGCAGGA GAACCAGGAGGCCAGGGTCTCTGAGGAGCAGAAAGTAGTTCAAGTGG TGGCCCCTGAGACAGGGCTGTGGCAGTGTCTACTGAGTGAAGGTGAT AAGGTCAAGATGGACTCCAGGATCCAGGTTTTATCCAGAGGGGTGAA CCAGACAGTGTTTCTGGCTTGCGTGCTGGGTGGCTCCTTCGGCTTTC TGGGTTTTCTTGGGCTCTGCATCCTCTGCTGTGTCAGGTGCCGGCAC CAACAGCGCCAGGCAGCACGAATGTCTCAGATCAAGAGGCTCCTCAG TGAGAAGAAGACCTGCCAGTGCCCCCACC GGATGCAGAAGAGCCATA ATCTCATCTGAAGCGGCCGCGTCGACTCGAGCGGGATCAATTCCGCC CCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGT GCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAA TGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTA GGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTC GTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGG	552
--	---	------------

Secuencia de polipéptidos CD3 delta-F2A-gamma-T2A-epsilon-P2A-zeta murino	MEHSGILASLILIAVLPQGS PFKIQVTEYEDKVFTCNTSVMHLDGT VEGWFAKNKTLNLGKGVLDPRGIYLCNGTEQLAKVVSSVQVHYRMCQ NCVELDSGT MAGVIFIDLIATLLLALGIYCFAGHETGRPSGAAEVQA LLKNEQLYQPLRDREDTQYSRLGGNWPRNKSGPVKQTLNFDLLKLA GDVESNPGPMEQRKGLAGLFLVISLLQGTVAQTNKAKNLVQVDGSRG DGSVLLTCGLTDKTIKWLKDGSIISPLNATKNTWNLGNNAKDPRGTY QCQGAKESTSNPLQVYYRMCENCIELNIGTISGFIFAEVISIFFLALG VYLIAGQDGVQRASRSDKQTLQNEQLYQPLKDREYDQYSHLQGNQL RKKRSEGRGSLTTCGDVEENPGPMRWNTFWGILCLSL LAVGTCQDDA ENIEYKVSISGTSVELTCPLSDENLKWEKNGQELPQKHDKHLVLQD FSEVEDSGYYVCYTPASNKNTILYLKARVCEYCEVDLTAVAI I I I V DICITLGLLMVIYYWSKNRKAKAKPVTRGTGAGSRPRGQNKERPPPV PNPDYEPKRGQRDLYSGLNQRAVGSATNFSLLKQAGDVEENPGPMK WKVSVLACILHVRFPGAEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVII TAL YLRAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPEM GGKQQRNRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRRGKGHGGLYQ GLSTATKDTYDALHMQTLAPR	553
Secuencia de polinucleótidos CD3 delta-F2A-gamma-T2A-epsilon-P2A-zeta murino	ATGGAACACAGCGGGATTCTGGCTAGTCTGATACTGATTGCTGTTCT CCCCCAAGGGAGCCCCCTTCAAGATACAAGTGACCGAATATGAGGACA AAGTATTTGTGACCTGCAATACCAGCGTCATGCATCTAGATGGAACG GTGGAAGGATGGTTTGCAAAGAATAAAACACTCAACTTGGGCAAAGG CGTTCTGGACCCACGAGGGATATATCTGTGTAATGGGACAGAGCAGC TGGCAAAGGTGGTGTCTTCTGTGCAAGTCCATTACCGAATGTGCCAG AACTGTGTGAGCTAGACTCGGGCACCATTGGCTGGTGTCTCTTCAT TGACCTCATCGCAACTCTGCTCCTGGCTTTGGGCATCTACTGCTTTG CAGGACATGAGACCGGAAGGCCTTCTGGGGCTGCTGAGGTTCAAGCA CTGCTGAAGAATGAGCAGCTGTATCAGCCTCTTCGAGATCGTGAAGA TACCCAGTACAGCCGTCTTGAGGGAACTGGCCCCGGAACAAGAAAT CCGGACCGGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCG GGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCCATGGAGCAGAGGAAGGGTCT GGCTGGCCTCTTCTCTGGTGATCTCTCTTCTTCAAGGCACTGTAGCCC AGACAAATAAAGCAAAGAATTTGGTACAAGTGGATGGCAGCCGAGGA GACGGTTCTGTACTTCTGACTTGTGGCTTGACTGACAAGACTATCAA GTGGCTTAAAGACGGGAGCATAATAAGTCCCTCTAAATGCAACTAAAA ACACATGGAATCTGGGCAACAATGCCAAAGACCCTCGAGGCACGTAT CAGTGTCAAGGAGCAAAGGAGACGTCAAACCCCTGCAAGTGTATTA CAGAATGTGTGAAAACCTGCATTGAGCTAAACATAGGCACCATATCCG GCTTTATCTTTCGTGAGGTCATCAGCATCTTCTTCTTCTTGCTCTTGGT GTATATCTCATTGCGGGACAGGATGGAGTTCGCCAGTCAAGAGCTTC AGACAAGCAGACTCTGTTGCAAATGAACAGCTGTACCAGCCCCTCA AGGACCGGGAATATGACCAGTACAGCCATCTCCAAGGAAACCAACTG AGGAAGAAGAGATCTGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGA CGTCGAGGAGAATCCTGGCCCAATGCGGTGGAACACTTTCTGGGGCA TCCTGTGCCTCAGCCTCCTAGCTGTTGGCACTTGCCAGGACGATGCC GAGAACATTGAATACAAAGTCTCCATCTCAGGAACCAAGTGTAGAGTT GACGTGCCCTCTAGACAGTGACGAGAACTTAAAATGGGAAAAAAATG GCCAAGAGCTGCCTCAGAAGCATGATAAGCACCTGGTGCTCCAGGAT TTCTCGGAAGTCGAGGACAGTGGCTACTACGTCTGCTACACACCAGC CTCAAATAAAAACACGTACTTGTACCTGAAAGCTCGAGTGTGTGAGT ACTGTGTGGAGGTGGACCTGACAGCAGTAGCCATAATCATCATTTGTT GACATCTGTATCACTCTGGGCTTGCTGATGGTCATTTATTACTGGAG	554

	CAAGAATAGGAAGGCCAAGGCCAAGCCTGTGACCCGAGGAACCGGTG CTGGTAGCAGGCCCAGAGGGCAAACAAGGAGCGGCCACCACCTGTT CCCAACCCAGACTATGAGCCCATCCGCAAAGGCCAGCGGGACCTGTA TTCTGGCCTGAATCAGAGAGCAGTCGGATCCGCCACGAACTTCTCTC TGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCCATGAAG TGGAAAGTGTCTGTTCTCGCCTGCATCCTCCACGTGCGGTGCCAGG AGCAGAGGCACAGAGCTTTGGTCTGCTGGACCCCAAACCTCTGCTACT TGCTAGATGGAATCCTCTTCATCTACGGAGTCATCATCACAGCCCTG TACCTGAGAGCAAAATTCAGCAGGAGTGCGAGAGCTGCTGCCAACCT GCAGGACCCCAACCAGCTCTACAATGAGCTCAATCTAGGGCGAAGAG AGGAATATGACGTCTTGGAGAAGAAGCGGGCTCGGGACCCAGAGATG GGAGGCAAACAGCAGAGGAGGAGGAACCCCAAGGAGCGTATACAA TGCATGCGAGAAAGACAAGATGGCAGAAGCCTACAGTGAGATCGGCA CAAAAGGCGAGAGGCGGAGAGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAG GGTCTCAGCACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCCCTGCATATGCA GACCCTGGCCCCCTCGCTAA	
Secuencia de polipéptidos de una proteína a luciferasa	MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHI EVNITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENSLOFFMPVLG ALFIGVAVAPANDIYNERELLNSMNISQPTVVFVSKKGLQKILNVQK KLPIIQKIIIMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDR DKTIALIMNSSGSTGLPKGVALPHRTACVRFSHARDPIFGNQIIPDT AILSVPFHHGFGMFTTLGYLICGFRVVLMYRFEEELFLRSLQDYKI QSALLVPTLFSFFAKSTLIDKYDLNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAK RFHLPGIRQGYGLTETTSAILITPEGDDKPGAVGKVVPPFEAKVVDL DTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSGYVNNPEATNALIDKDGWLHSGDI AYWDEDEHFFIVDRLKSLIKYQYQVAPAELESILLQHPNIFDAGVA GLPDDDAGELPAAVVLEHGKTMTEKEIVDYVASQVTTAKKLRGGVV FVDEVPKGLTGKLDARKIREILIKAKKGKSKL	555
Secuencia de polinucleótidos que codifican una proteína a luciferasa	AAAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACTGT TTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTA TTTTGACACCCCCATAATATTTTCCAGAATTAACAGTATAAATTGC ATCTCTTGTTCAAGAGTTCCTTATCACTCTCTTTAATCACTACTCAC AGTAACCTCAACTCCTGCCACAGGTACCGAGCTCAAGTTTGTACAAA AAAGCAGGCTGCCACCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCC CGGCGCCATTCTATCCGCTAGAGGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTG CATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTT TACAGATGCACATATCGAGGTGAACATCACGTACGCGGAATACTTCG AAATGTCCGTTCCGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAAT ACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTCTTCAATTCTT TATGCCGGTGTTGGGCGGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCCG CGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGAACATT TCGCAGCCTACCGTAGTGTTTGTTCAAAAAGGGGTTGCAAAAAAT TTTGAACGTGCAAAAAAAATTACCAATAATCCAGAAAATTATTATCA TGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTTCAAGTCGATGTACACGTTT GTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTACC AGAGTCCTTTGATCGTGACAAAACAATTGCACTGATAATGAACTCCT CTGGATCTACTGGGTACCTAAGGGTGTGGCCCTTCCGCATAGAACT GCCTGCGTCAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTTGGCAATCA AATCATTCGGGATACTGCGATTTTAAGTGTTGTTCCATTCCATCACG GTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTTCGA GTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTTTACGATCCCT	556

	TCAGGATTACAAAATTCAAAGTGCGTTGCTAGTACCAACCCTATTTT CATTCCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAAT TTACACGAAATTGCTTCTGGGGGCGCACCTCTTTCGAAAGAAGTCGG GGAAGCGGTTGCAAAACGCTTCCATCTTCCAGGGATACGACAAGGAT ATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGG GATGATAAACC GGCGCGGTTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGC GAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAGA GAGGCGAATTATGTGTCAGAGGACCTATGATTATGTCCGGTTATGTA AACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCT ACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCA TAGTTGACCGCTTGAAGTCTTTAATTAAATACAAAGGATACCAGGTG GCCCCCGCTGAATTGGAGTCGATATTGTTACAACACCCCAACATCTT CGACGCGGGCGTGGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAAC TTC CCGCCGCCGTTGTTGTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAA GAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTT GCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCG GAAAACTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAG AAGGGCGGAAAAGTCCAAATTGTAA	
Secuenci a de polinuc leótido s que codific an TCR IGRP muriniz adas	CTGGGAGCAAACACCGTGGATGGTGGAAATCACTCAGTCCCCAAAGTA CCTGTTTCAGAAAGGAAGGACAGAATGTGACCCTGAGTTGTGAACAGA ATTTGAACCACGATGCCATGTACTGGTACCGACAGGACCCAGGGCAA GGGCTGAGATTGATCTACTACTCACAGATAGTAAATGACTTTCAGAA AGGAGATATAGCTGAAGGGTACAGCGTCTCTCGGGAGAAGAAGGAAT CCTTTCCTCTCACTGTGACATCGGCCCCAAAAGAACCCGACAGCTTTC TATCTCTGTGCCAGTGGGGGACGGGTCTATCAGCCCCAGCATTTTGG TGATGGGACTCGACTCTCCATCCTAGAGGATCTGAGAAATGTGACTC CACCCAAGGTCTCCTTGTTTGAGCCATCAAAAGCAGAGATTGCAAAC AAACAAAAGGCTACCCTCGTGTGCTTGGCCAGGGGCTTCTTCCCTGA CCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGCAAGGAGGTCCACAGTG GGGTCAGCACGGACCTCAGGCCTACAAGGAGAGCAATTATAGCTAC TGCCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCTGCTACCTTCTGGCACAATCC TCGCAACCACTTCCGCTGCCAAGTGCAGTTCCATGGGCTTTCAGAGG AGGACAAGTGGCCAGAGGGCTCACCCAAACCTGTACACAGAACATC AGTGCAGAGGCCTGGGGCCGAGCAGACTGTGGGATTACCTCAGCATC CTATCAACAAGGGGTCTTGTCTGCCACCATCCTCTATGAGATCCTGC TAGGGAAAGCCACCTGTATGCTGTGCTTGTGAGTACACTGGTGGTG ATGGCTATGGTCAAAAGAAAGAATTCATGA	557