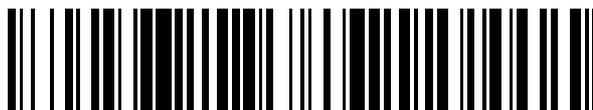


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 336**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/50 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06742659 .3**
96 Fecha de presentación: **24.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1880015**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2008**

54 Título: **MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS CELULARES T CD4+.**

30 Prioridad:
22.04.2005 EP 05008924

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.12.2011

73 Titular/es:
**HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN DEUTSCHES
FORSCHUNGSZENTRUM FÜR GESUNDHEIT UND
UMWELT (GMBH)
INGOLSTÄDTER LANDSTRASSE 1
85764 NEUHERBERG, DE**

72 Inventor/es:
**MAUTNER, Josef;
BEHREND, Uta y
MILOSEVIC, Slavoljub**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 370 336 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de identificación de antígenos celulares T CD4+

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a un método de identificación antígenos celulares T CD4+. Las células T (TC) CD4+ juegan un papel principal en la orquestación de las respuestas inmunes adaptativas. Al proporcionar ayuda en forma de citoquinas secretadas o señales de la superficie celular, las TC inician y controlan las funciones humorales específicas de antígeno y efectoras celulares y mantienen la memoria inmunológica. De este modo, la identificación de antígenos reconocidos por las TC es esencial para entender y modular las respuestas inmunes adaptativas. Las TC reconocen complejos de péptido /MHC II en la superficie de células presentadoras de antígenos profesionales (pAPC), por ejemplo, macrófagos, células B y células dendríticas (DC). Los péptidos presentados en moléculas MHC de clase II derivan mayoritariamente de proteínas exógenas o de membrana celular procesadas en el compartimento endosómico /lisosómico.
- 10
- 15 **[0002]** Existen dos clases de moléculas MHC, la clase I y la clase II, que se diferencian funcionalmente por el tipo de antígeno al que se unen y el subgrupo de células T con los que interactúan. La dicotomía entre las moléculas de clase I y la clase II se refiere a sus diferentes papeles en la activación de células T. Las moléculas de clase I presentan péptidos a los linfocitos T citotóxicos (CTL) positivos de CD8 limitados a MHC de clase I. Estas células lisan directamente las células diana. Dado que las moléculas de clase I son expresadas por casi todas las células nucleadas, los CTL son capaces de reconocer y destruir prácticamente cualquier célula si presenta el complejo MHC/péptido apropiado. Por otro lado, las moléculas de clase II presentan péptidos a células T CD4+, la función primaria de las cuales es secretar citoquinas y expresar moléculas de la superficie celular que inducen actividades de otros linfocitos, incluyendo células B, macrófagos y CTL. Juegan un papel dominante en la orquestación de una respuesta inmune.
- 20
- 25 **[0003]** Se deseó durante mucho tiempo identificar aquellos antígenos que podrían conducir a una activación de TC a efectos de inducir o evitar respuestas inmunes.
- 30 **[0004]** En el pasado, se han desarrollado métodos diferentes para la identificación de antígenos reconocidos por TC. Se han identificado dos antígenos tumorales reconocidos por TC específicas de melanomas mediante la purificación bioquímica de proteínas antigénicas de lisados tumorales combinados con la secuenciación por espectrometría de masas (Monach et al., 1995; Pieper et al., 1999). En esta estrategia, las fracciones de proteínas obtenidas mediante métodos de separación bioquímica se añaden a cultivos de APC, que captan, procesan y presentan estos antígenos exógenos en MHC de clase II, donde se pueden reconocer por TC específicas de antígeno. Las fracciones positivas se separan posteriormente, y por último el antígeno reconocido por las TC es identificado por espectrometría de masas en fracciones positivas altamente purificadas. Dado que las proteínas difieren en su comportamiento bioquímico, el procedimiento de purificación debe ajustarse para cada antígeno. Además, el equipo técnico altamente sofisticado requerido para la identificación de antígenos excluye una aplicación más amplia de esta estrategia.
- 35
- 40 **[0005]** Los intentos por aislar péptidos antigénicos directamente de las moléculas MHC de clase II aplicados para la identificación de péptidos reconocidos por TC mediante el análisis de secuencia de espectrometría de masas han sido insatisfactorios en la mayoría de los casos para péptidos reconocidos por TC. A diferencia de las moléculas MHC de clase I, el surco de unión del péptido de las moléculas de clase II presenta extremos abiertos y acomoda péptidos heterogéneos de longitud. Sin embargo, se identificó un péptido derivado de gp100 utilizando esta estrategia (Halder et al., 1997).
- 45
- 50 **[0006]** Se han identificado varios antígenos de TC específicas de melanoma mediante una estrategia de clonación de la expresión de ADNc modificado desarrollada originalmente para identificar antígenos tumorales limitados a MHC de clase I (De Plaen et al., 1997; Wang et al., 1999a; Wang et al., 1999b). Para superar las diferencias en la presentación de antígenos, los ADNc se fusionaron al gen de cadena invariante. Las secuencias señal en los primeros 80 aminoácidos de cadena invariante dirigen las proteínas de fusión resultantes en el compartimento endosómico/lisosómico donde tiene el lugar el procesamiento y carga en las moléculas de MHC de clase II (Fujii et al., 1998; Sanderson et al., 1995; van Bergen et al., 1997). Como línea celular receptora para la expresión de bibliotecas de ADNc, las células HEK293 altamente transfectables se modificaron genéticamente para convertirse en pAPC artificiales. Las células se transfectaron de forma estable con ADNc que codifica HLA-D α y -D β , que forman el elemento de restricción de la MHC de clase II apropiado, HLA-DM α y -DM β , que facilitan la unión de péptidos a moléculas MHC de clase II, y la cadena invariante, que dirige moléculas MHC de clase II recién sintetizadas en el compartimento de procesado y carga de MHC de clase II (Wang et al., 1999b). Este método depende del conocimiento de la molécula MHC limitante y requiere la transfección estable de células HEK293 con cinco genes diferentes.
- 55
- 60

5 [0007] La metodología más reciente desarrollada para la identificación de antígenos de TC es mediante la clonación de expresión bacteriana. Se utilizó una biblioteca de expresión fagos λ establecida a partir de ADN genómico de tuberculosis de Mycobacterium por Alderson et al. Para la identificación de antígenos reconocidos por TC específicas para este patógeno humano (Alderson et al., 2000). Las células dendríticas (DC) o macrófagos se incubaron con E. coli infectado con antígenos micobacterianos que expresan fagos λ . Después de la fagocitosis de las bacterias completas, los péptidos derivados de proteínas expresadas bacterionalmente se presentan en moléculas MHC de clase II. Mediante la sonda de estas APC con TC, se identificaron las bacterias individuales que expresan los antígenos.

10 [0008] Recientemente se aplicó una estrategia similar para definir el antígeno reconocido por TC específica de antígeno menor de histocompatibilidad (mHA) (Sahara y Shastri, 2003). En lugar de fagos λ , se expresó una biblioteca de plásmidos de ADNc en E. coli y se alimentaron conjuntos de bacterias transformadas en DC. Utilizando un antígeno modelo, se verificó recientemente la viabilidad y sensibilidad de esta estrategia con líneas celulares linfoblastoides (LCL) transformadas por EBV humano como APC y bacterias opsonizadas con complemento, dando lugar a la detección del antígeno modelo en grupos de 300 bacterias que expresan proteínas irrelevantes (van de Corput et al., 2005). Sin embargo, sólo una pequeña proporción de genes eucariotas se expresan en niveles suficientemente elevados en bacterias para permitir tamaños de grupo tan grandes. Debido a que la mayoría de las proteínas se expresan en niveles significativamente inferiores, muchos antígenos permanecerán no detectados con esta estrategia.

20 [0009] Sanderson et al describe en la "Identificación de un antígeno estimulante de células T CD4+ de bacterias patogénicas por la clonación de la expresión", Journal of Experimental Medicine, vol. 182, no. 6, Diciembre 1995, un método de identificación de antígenos celulares T CD4+ que comprende proporcionar un ácido nucleico que codifica un antígeno de células que expresan antígenos o tejido y obtener fragmentos antigénicos de dicho ácido nucleico, y expresar uno o más de dichos fragmentos en una célula huésped adecuada. Los fragmentos antigénicos son de un tamaño de 1-4 kb y no se expresan como proteínas de fusión con un marcador adecuado.

30 [0010] Por lo tanto, Un problema subyacente en la presente invención es proporcionar un método mejorada de identificación de antígenos de células auxiliares T. Un objeto adicional de la invención es identificar y proporcionar antígenos de células auxiliares T desconocidos hasta ahora. Estos problemas se resuelven por la materia de la reivindicación independiente 1. Las realizaciones preferidas se establecen en las reivindicaciones dependientes.

[0011] En resumen, la presente invención proporciona las siguientes ventajas y resultados:

35 [0012] Los inventores desarrollaron un procedimiento simple y fiable para localizar epítomos en antígenos y para la identificación de los mismos. Se describe una estrategia simple y rápida de clonación de la expresión de ADNc bacteriano que permite la identificación rápida de antígenos de células auxiliares T. Los fragmentos antigénicos cortos creados mediante la digestión con enzimas de restricción de corte frecuente se unen al azar a la secuencia codificante de un gen marcador, por ejemplo y preferiblemente cloramfenicol transferasa (CAT) en un vector de expresión bacteriano. Las bacterias que expresan proteínas de fusión antígeno-CAT se alimentan a continuación directamente a las células presentadoras de antígenos con MHC de clase II+ y se sondan con TC específicas de antígeno. Las colonias bacterianas reconocidas por TC se expanden, y los fragmentos antigénicos se identifican por extracción de plásmido y análisis de secuencia. Utilizando esta estrategia, se identificaron por ejemplo dos antígenos reconocidos por TC específicas del virus Epstein-Barr (EBV). La simplicidad y alta sensibilidad de este método facilita la identificación de antígenos en bibliotecas de ADNc complejas.

[0013] La presente invención en particular se refiere a los siguientes aspectos y realizaciones:

50 [0014] Según un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de identificación de antígenos de TC según la reivindicación 1.

55 [0015] Las desventajas principales de los métodos de la técnica anterior de identificación de antígenos de TC se superan por la presente estrategia. Tal como se ha mencionado anteriormente, ya se sabe que expresan proteínas potencialmente antigénicas, por ejemplo, de origen humano, en células bacterianas mediante la incubación con APC positivas en MHC II. Sin embargo, una desventaja que está implicada en este método es el nivel de expresión fuertemente variante de estos antígenos potenciales en células bacterianas. Muchas proteínas eucariotas son tóxicas para E. coli, dando lugar a niveles de expresión bajos o indetectables. Además, las proteínas grandes (>100 kDa) se expresan muy poco en bacterias.

60 [0016] A diferencia de esto, el presente método presenta la ventaja de proporcionar una expresión elevada y uniforme de los antígenos en células huésped seleccionadas de células bacterianas. Mediante la fragmentación proporcionada en la presente invención, es también posible analizar antígenos, que, en general, serían tóxicos para

la célula huésped.

5 **[0017]** Cabe indicar que en general se expresa un único fragmento antigénico potencial en la proteína de fusión en la etapa b). Sin embargo, también es viable incluir dos o más, por ejemplo, tres fragmentos más cortos en el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión.

[0018] En general, el término "ácido nucleico" tal como se utiliza en la presente invención, comprende tanto ARN como ADN, incluyendo ADNc, ADN genómico, y ADN sintético (por ejemplo, sintetizado químicamente).

10 **[0019]** Según una realización preferida, los fragmentos se obtienen mediante la separación del ácido nucleico que codifica el antígeno con una o más enzimas de restricción de corte frecuente, que se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste Acil, MnlI, BsaJI, y CviJI.

15 **[0020]** Cabe indicar que preferiblemente se utilizan enzimas que reconocen una secuencia de reconocimiento de AND de cuatro o menos bases. Por ejemplo, para la enzima Acil la secuencia de reconocimiento es CCGC, para MnlI CCTC. Secuencias de reconocimiento incluso más cortas son RGCY para CviJI.

20 **[0021]** Sin embargo, también es posible producir fragmentos cortos de ADN mediante otros métodos biológicos, químicos o físicos, incluyendo la digestión parcial por nucleasas (por ejemplo DNaseI) o sonicación.

25 **[0022]** Según la presente invención, los fragmentos presentan un tamaño que varía de aproximadamente 25 a aproximadamente 300 pb, preferiblemente de 40 a 200 bp y lo más preferible aproximadamente 90 bp. O en otras palabras, los fragmentos de proteínas antigénicas varían en tamaño de aproximadamente 9 a aproximadamente 100 aminoácidos. Fragmentos más cortos no funcionarán adecuadamente, ya que los péptidos necesitan una longitud de por lo menos 9 aminoácidos para la unión a moléculas de MHC II. Los fragmentos de más de 300 pb no se incluyen en la presente invención, ya que fragmentos superiores a 300 pb se expresan normalmente en niveles muy inferiores y/o dificultan la función del marcador (por ejemplo, CAT).

30 **[0023]** Un intervalo más preferido es de 40 a 200 pb. Lo más preferido es aproximadamente 90 pb.

[0024] La célula huésped para expresar la proteína de fusión se selecciona preferiblemente a partir de células bacterianas. Las células bacterianas preferidas son E. coli y B. subtilis.

35 **[0025]** En una realización preferida, los fragmentos se expresan como una proteína de fusión mediante la introducción de un vector de expresión, preferiblemente un plásmido, que contiene la secuencia de ácido nucleico que codifica el fragmento y un marcador, en la célula huésped.

40 **[0026]** El vector de expresión comprende preferiblemente una o más secuencias reguladoras. El término "vector de expresión" se refiere en general a un plásmido o fago o virus o vector, para expresar un polipéptido de una secuencia de ADN (ARN). Un vector de expresión puede comprender una unidad transcripcional que comprende un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen una función reguladora en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y se traduce en proteína, y (3) las secuencias de inicio y terminación adecuadas de la transcripción. Las unidades estructurales para utilizar en sistemas de expresión en levadura o eucariota incluyen preferiblemente una secuencia líder que permite la secreción extracelular de proteína traducida por una célula huésped.

50 **[0027]** El vector de expresión puede contener secuencias "funcionales" adicionales, dependiendo de los métodos de detección utilizados en el presente método. Por ejemplo, el vector de expresión puede comprender una secuencia de reconocimiento de anticuerpos para la posterior transferencia Western y/o etiqueta de His.

[0028] En una realización preferida particular, el gen marcador se selecciona entre genes de Resistencia a antibiótico, preferiblemente cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) o entre genes marcadores fluorescentes, preferiblemente que codifican la proteína fluorescente verde o roja o LacZ.

55 **[0029]** Por ejemplo, las colonias bacterianas que expresan el producto de fusión LacZ se pueden identificar a través de tinción con XGal.

[0030] Además, la presente invención comprende todos los genes marcadores que producen productos génicos esenciales para el crecimiento de bacterias mutantes (que no expresan el producto génico).

60 **[0031]** La fusión de los fragmentos antigénicos a CAT ofrece varias ventajas. En primer lugar, el tratamiento con cloramfenicol permite la selección de bacterias que expresan proteínas de fusión antígeno-CAT en el marco, lo cual reduce ampliamente el número de colonias a cribar. En segundo lugar, los fragmentos antigénicos fusionados a CAT

se expresan a un nivel elevado, incluso cuando derivan de proteínas tóxicas para las bacterias. En tercer lugar, el nivel de expresión uniformemente elevado de proteínas de fusión antígeno-CAT permite establecer tamaños de grupos grandes y representativos.

5 **[0032]** El ácido nucleico que codifica el antígeno es preferiblemente ADNc obtenido mediante la transcripción de ARNm aislado de las células que expresan antígeno o tejido en ADNc.

[0033] En la etapa c) las APC se seleccionan preferiblemente entre células dendríticas, macrófagos y linfocitos, preferiblemente de una línea celular linfoblastoide (LCL).

10 **[0034]** Después de la etapa d), el método de la invención puede comprender adicionalmente la expansión de las células huésped que expresan las proteínas de fusión que activan las TC específicas de antígeno y la identificación de los fragmentos antigénicos contenidos en las mismas mediante análisis de secuencia.

15 **[0035]** La activación de dichas TC se mide preferiblemente determinando la secreción o proliferación de citoquinas. Esto se lleva a cabo preferiblemente mediante ELISA con citoquinas. Sin embargo, existen métodos adicionales para medir a mano, por ejemplo detector GFP en TC después de la activación (antes se introdujeron GFP codificadas por una construcción génica informadora en dichas TC).

20 **[0036]** En general, el antígeno deriva de patógenos que incluyen bacterias y virus, o de bibliotecas de ADNc. Sin embargo, fuentes adicionales de proteínas antigénicas pueden incluir todo tipo de tejidos, en particular tejidos humanos, preferiblemente explantes de tumores en el caso de pacientes con tumores o tejidos inflamados en casos de autoinmunidad o infección.

25 **[0037]** Según una realización adicional, se aíslan las TC específicas de antígeno mediante estimulación in vitro de células estimuladoras autólogas. Las TC se aislaron de sangre periférica, órganos linfoides secundarios (por ejemplo, nódulos linfáticos) o tejido de pacientes (por ejemplo, explantes de tumores en el caso de pacientes con tumores o tejidos inflamados en casos de autoinmunidad o infección). Las TC se estimularon repetidamente in vitro utilizando células presentadoras de antígenos apropiada (por ejemplo, células tumorales) hasta que se obtienen
30 líneas de TC con reactividad selectiva contra el tejido diana.

[0038] Más adelante en la presente invención se describe un antígeno de TC que se identificó mediante el método descrito anteriormente.

35 **[0039]** La identificación de antígenos de TC forma la base de varias aplicaciones científicas y clínicas. Dada el papel central de las TC en las respuestas inmunes adaptativas, la elucidación y caracterización de respuestas inmunes específicas de antígeno dependen de la identificación de antígenos de TC.

40 **[0040]** Además, los antígenos de TC proporcionan marcadores de diagnóstico y pronóstico valiosos. Por ejemplo, las respuestas inmunes humorales controladas por TC contra ciertos antígenos sólo tiene lugar en pacientes con cáncer y a menudo mucho antes de la detección del tumor mediante los métodos de diagnóstico actuales (Behrends et al., 2002). Asimismo, se han identificado respuestas inmunes contra MUC1 como un marcador de pronóstico favorable en pacientes con cáncer pancreático (Hamanaka et al., 2003).

45 **[0041]** Además, la definición de antígenos de TC es obligatoria para la modulación de respuestas inmunes específicas de antígeno, incluyendo inmunizaciones activas y pasivas, así como otras formas de inmunoterapia.

[0042] Además, la presente invención describe un método para seleccionar variantes heterocliticas de los antígenos identificados. Mediante la expresión y análisis de mutantes de los antígenos identificados como proteínas de fusión, se pueden identificar aquellas variantes que provocan respuestas de células T más fuertes o más débiles. Por ejemplo, el intercambio de los aminoácidos que son responsables de la unión a MHC puede conducir a variantes de péptidos que se unen con una afinidad superior y, de este modo, inducen respuestas de células T más fuertes, por ejemplo, en experimentos de vacunación. En cambio, el intercambio de aminoácidos que interaccionan con el receptor de células T puede conducir a péptidos antigénicos que ya no activan más la célula T, pero inducen en cambio anergia. Dichas variantes de antígenos son de ayuda en la reducción de respuestas inmunes no deseadas, por ejemplo, en enfermedades autoinmunes. De este modo, esto proporciona un método para seleccionar variantes de antígenos de TC que comprende las etapas de identificación de un antígeno de TC mediante un método definido anteriormente y seleccionar variantes de antígeno con una capacidad estimuladora de células T aumentada o disminuida en comparación con dicho antígeno.

60 **[0043]** La presente invención describe adicionalmente un método para detectar una enfermedad en un paciente, preferiblemente un paciente humano, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar TC de dicho paciente;
- b) poner en contacto un antígeno específico de la enfermedad tal como se ha definido anteriormente con dichas TC;
- y
- c) detectar si las TC son específicas para dicho antígeno específico de la enfermedad.

[0044] La detección en la etapa c) se puede realizar mediante técnicas conocidas en el sector, por ejemplo mediante FACS o ensayo ELISPOT.

[0045] Este método de detección se puede utilizar para la detección y/o pronóstico precoz de diversas enfermedades, en particular cáncer o enfermedades de autoinmunidad. Por ejemplo, en el caso de la detección precoz del cáncer, se derivan las TC de un paciente (por ejemplo, tomando una muestra de sangre de dicho paciente), las TC se aíslan y se ponen en contacto con un antígeno, que se ha demostrado mediante el método de la presente invención que es un antígeno específico del cáncer y específico de TC. Una reacción positiva indicará que el paciente padece de cáncer.

[0046] Los materiales, métodos y ejemplos que se indican a continuación son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

[0047] La presente invención se ilustra a continuación mediante los dibujos que se acompañan en los que se muestra lo siguiente:

Figura 1

(A) Representación esquemática del vector de expresión. Los plásmidos de expresión F315A, B y C son derivados del plásmido de expresión bacteriana pTrcHisA (Invitrogen), que contienen un promotor inducible por IPTG y un punto de partida de la traducción (ATG) para la expresión de proteínas de fusión etiquetadas con epítipo para anticuerpo (AntiXpress) y de His en N terminal. En este plásmido, la secuencia codificante de la cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) se insertó junto con un sitio de clonación múltiple (MCS). Este MCS contiene secuencias de reconocimiento únicas para varias enzimas de restricción que permiten la inserción de fragmentos antigénicos de extremos romos o adaptadores de ADN de extremos cohesivos. Los sitios *Stu*I y *Msc*I están separados por el codón de parada en los tres marcos de lectura (recuadros sombreados) para evitar la expresión de CAT de plásmidos no recombinantes. Los plásmidos F315A, B y C difieren en uno o dos nucleótidos insertados sólo delante del sitio de clonación múltiple. (B) Las proteínas de fusión están altamente expresadas en bacterias. Para valorar la expresión de proteínas de estos plásmidos, se insertaron al azar fragmentos antigénicos cortos en el MCS. Después de la transformación, las bacterias se colocaron en placas de agar que contenían cloramfenicol y se examinaron posteriormente trece colonias bacterianas. Los extractos bacterianos se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante tinción con Coomassie® y transferencia Western utilizando el anticuerpo AntiXpress. La traducción de la proteína expresada por la colonia #6 se inicia en un ATG en el fragmento de ADNc, ocasionando una proteína de fusión antígeno-CAT que carece de la etiqueta de His y el epítipo de anticuerpo.

Figura 2

Experimentos de presentación de antígenos utilizando cultivos líquidos de bacterias transformadas y proteínas purificadas. Las bacterias transformadas con el plásmido F216 que codifica el epítipo reconocido por el clon M1-E5 de células T específicas de M1 de la gripe o con un plásmido que codifica un epítipo irrelevante, se desarrollaron como cultivos líquidos y se indujo la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG cuando los cultivos alcanzaron una DO600 de 0,8. Las bacterias se recogieron cuatro horas más tarde mediante centrifugación y se resuspendieron hasta una DO600 de 5. Se añadieron diferentes proporciones de bacterias transformadas con el plásmido F216 y bacterias transformadas con un plásmido de control que codifica una proteína de fusión irrelevante a 1×10^3 LCL autólogas en 200 μ l de medio LCL suplementado con 100 μ g/ml de gentamicina para terminar el crecimiento bacteriano. En paralelo, la proteína de fusión F216 purificada (500 μ g/ml) y la proteína de control (500 μ g/ml) se mezclaron en las proporciones indicadas y se añadieron a LDL. Después de 24 horas de incubación, se añadieron 1×10^5 células T CD4+ y se determinó la secreción de citoquinas por las células T 20 horas más tarde mediante ELISA. Las células T reconocieron específicamente células diana incubadas con las bacterias completas o proteína purificada con eficacia similar durante un intervalo amplio de concentraciones.

Figura 3

Identificación de los epítopos de células T con antígenos conocidos.

Las secuencias codificantes de los antígenos de EBV, BALF4 y BRLF1, se separaron con enzimas de restricción de corte frecuente y los fragmentos de unieron al vector de expresión. Después de la transformación, las bacterias se

cultivaron en placas de 96 pocillos a 14 cfu/pocillo en el caso de BALF4 y a 60 cfu/pocillo para BRLF1. Después de una incubación durante la noche, se transfirieron 100 μ l de cada pocillo a 1,5 ml de medio de supercaldo en un bloque de 96 pocillos profundos y el resto se congeló como palca madre en glicerol al 20%. Las bacterias se recogieron mediante centrifugación cuando la densidad óptica alcanzó una DO600 de 1, y se resuspendieron en 300 μ l de medio. De cada pocillo, se añadieron 10 μ l a APC y se cocultivaron durante 20 horas antes de la adición de células T. Después de 24 horas, se midió la secreción de GM-CSF por las células T mediante ELISA. (A) Las células T B5 BALF4 reconocieron cinco grupos de los cuales se analizó D1 posteriormente. Las bacterias de este grupo se emplacaron en placas de agar. De las 36 colonias individuales analizadas, 16 fueron reconocidas por las células T. El análisis de las secuencias de los plásmidos mostró que todas expresaron el mismo péptido de 27 aminoácidos derivado de BALF4 fusionado en el marco con CAT. El epítipo, marcado como una secuencia en un recuadro, se verificó utilizando oligonucleótidos sintéticos que abarcan parcialmente la región identificada. La biblioteca de BRLF1 se analizó de la misma manera utilizando clones 3A10 (B) y 1H3 (C). La colonia individual reconocida por el clon 3A10 contenía una inserción que codificaba un péptido de 27 aminoácidos derivado de BRLF1. El epítipo reconocido por las células T se determinó utilizando adaptadores de ADN (representados como la secuencia en un recuadro). Las bacterias individuales reconocidas por las células T 1H3 transportaban todas un plásmido con una inserción corta del gen de BRLF1 que codificaba un péptido de 19 aminoácidos.

Figura 4

20 Identificación de antígenos de EBV desconocidos

Se purificó el ADN genómico de EBV, se digirió con enzimas de restricción de corte frecuente y se unieron pequeños fragmentos de ADN en la mezcla de vectores de expresión bacterianos. Los cultivos bacterianos líquidos en una placa de 96 pocillos se inocularon con 60 cfu/pocillo. Las suspensiones bacterianas se añadieron a APC tal como se ha descrito y posteriormente se sondaron con los clones F7 y G11-3 de células T específicas de EBV. Estos clones de células T se habían generado mediante la estimulación repetida de PBL con LCL autólogas. (A) El clon G11-3 de células T reconoció el grupo B12 que contenía una colonia positiva E1. El plásmido de la colonia E1 transportaba una inserción de 147 pb. La búsqueda de homología del Banco de Genes mostró que la inserción deriva del gen de BNFR1, que codifica una proteína del tegumento de EBV. Utilizando adaptadores sintéticos, se determinó el epítipo reconocido por las células T (secuencia en un recuadro). (B) El clon de células T también reconoció un grupo positivo individual A11, del cual se derivaron seis colonias de bacterias positivas. El análisis de secuencia reveló que todas transportaban la misma inserción de 66 pb derivada del gen de BALF4.

Figura 5

35 Reconocimiento eficaz de bacterias que expresan las proteínas de fusión antígeno-CAT, pero no las proteínas completas.

Las colonias bacterianas que expresaban las proteínas de fusión antígeno-CAT, así como las bacterias que expresaban el ORF completo del antígeno en el mismo vector de expresión, se cultivaron tal como se ha descrito y se sondaron con células T específicas. Las bacterias que expresaban las proteínas de fusión antígeno-CAT fueron reconocidas de manera eficaz sobre un intervalo amplio de concentraciones. En cambio, las bacterias que expresaban el ORF completo de los antígenos no fueron reconocidas o lo fueron en un grado mucho menor, incluso cuando se utilizó la concentración más elevada de bacterias (108/pocillo).

Figura 6

Representación esquemática del vector de expresión.

Los plásmidos de expresión F288A, B y C son derivados del plásmido de expresión bacteriana pTrcHisA (Invitrogen), que contiene un promotor inducible por IPTG y un sitio de inicio de la traducción (ATG) para la expresión de proteínas de fusión etiquetadas con epítipo para anticuerpo (AntiXpress) y de His en N terminal. En este plásmido, la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (GFP) se insertó junto con un adaptador que codificaba un péptido glicina-serina (G-S) flexible y un sitio de clonación múltiple (MCS). Este MCS contiene secuencias de reconocimiento únicas para varias enzimas de restricción que permiten la inserción de fragmentos antigénicos de extremos romos o adaptadores de ADN de extremos cohesivos. Los sitios *Stu*I y *Msc*I están separados por el codón de parada en los tres marcos de lectura (recuadros sombreados) para evitar la expresión de GFP de plásmidos no recombinantes. Los plásmidos F288A, B y C difieren en uno o dos nucleótidos insertados sólo delante del sitio de clonación múltiple.

Figura 7

Las colonias bacterianas que expresan las proteínas de fusión antígeno-GFP son verdes. La secuencia codificante de EBNA3A se digirió con enzimas de restricción de corte frecuente y se unió a la mezcla de vectores de expresión. Después de la transformación, las bacterias se sembraron en placas de agar LB que contenían antibióticos e IPTG 1 mM. Después de la incubación durante la noche, aproximadamente un 10% de las colonias crecientes presentaban una apariencia fluorescente verde bajo la luz de día.

Figura 8

Identificación del epítipo reconocido por el clon 3A-3D5 del clon de células T específicas de EBNA3A.

Se escogieron colonias verdes individuales y se utilizaron para inocular cultivos líquidos en cinco placas de microtitulación de 96 pocillos (I-V). De cada placa, se prepararon dos grupos de 48 colonias individuales (designadas como A y B) y, después de la inducción de la expresión de proteínas, se aislaron las proteínas recombinantes etiquetadas con His. (A) Se incubaron PBMC con los grupos de proteínas purificadas durante 24 horas, y a continuación, se sondaron con las células T específicas de EBNA3A. Al día siguiente, se analizaron 100 μ l de sobrenadante por la secreción de GM-CSF mediante ELISA. Seis de los diez grupos analizados resultaron positivos en el ensayo. Las PBMC solas y las PBMC incubadas con proteína EBNA3A recombinante sirvieron como controles. (B) Las proteínas se purificaron a partir de las 96 colonias bacterianas individuales de la placa madre I, de la cual derivaban los grupos positivos IA y IB, y se analizaron individualmente. Después de 24 horas de incubación de LCL con las proteínas, se añadió el clon de células T GM-CSF y se determinó la secreción de GM-CSF 20 horas más tarde. Las colonias bacterianas en los pocillos D1 y E5 expresaron una proteína que estimulaba la secreción de citoquinas por el clon de células T. (C) Se extrajeron los plásmidos de las bacterias D1 y E5 y se secuenciaron las inserciones. El plásmido de la colonia D1 portaba una inserción de 45 pb derivada de la digestión con HaeIII de la CDS de EBNA3A, mientras que la inserción en la colonia E5 comprendía 68 pb y derivaba de la digestión parcial de la CDS de EBNA3A con una combinación de HaeIII y BsaJI. La secuencia de aminoácidos correspondiente codificada por las inserciones debajo. El epítipo se verificó analizando un péptido sintético que abarcaba un solapamiento de 16 aminoácidos en un ensayo de reconocimiento de células T (datos no mostrados).

Figura 9

Definición de la secuencia central del epítipo utilizando adaptadores de ADN.

Para definir la secuencia central del epítipo, se sintetizaron cinco adaptadores de ADN (L1-L6) que codificaban el solapamiento parcial de los péptidos de 12 aminoácidos que abarcaban el epítipo de EBNA3A (marcado en gris oscuro). Los adaptadores se insertaron en el vector de expresión y las proteínas recombinantes resultante se purificaron y se analizaron en un ensayo de reconocimiento de células T (representado a la derecha). Los adaptadores L2, 3, 4 y 5 dieron lugar a proteínas que fueron reconocidas por el clon 3A-3D5 de células T específicas de EBNA3A, mientras que las proteínas derivadas de los adaptadores L1 y L6 no lo fueron. Los péptidos de EBNA3A codificados por los adaptadores L2-5 se solapan en nueve aminoácidos (marcados en gris claro).

Figura 10

Experimentos de presentación de antígenos utilizando cultivos líquidos de bacterias transformadas

Las bacterias transformadas con el plásmido D1 que codificaba el epítipo reconocido por el clon 3A-3D5 de células T específicas de EBNA3A, o el plásmido F216 que codificaba el epítipo reconocido por el clon M 1-E5 de células T específicas de M1 de gripe, se desarrollaron como cultivos líquidos y se indujo la expresión de la proteína cuando los cultivos alcanzaron una DO600 de 0,8. Las bacterias se recogieron cuatro horas más tarde mediante centrifugación, y se resuspendieron en medio LB hasta una DO de 5. Se añadieron diferentes volúmenes de las suspensiones bacterianas a 1×10^5 LCL autólogas en 200 μ l de medio LCL suplementado con 50 μ g/ml de gentamicina para terminar el crecimiento bacteriano. Después de 24 horas de incubación, se extrajeron 100 μ l de medio y se añadieron 1001 μ l de medio LCL que contenía 1×10^5 células T CD4+ y se determinó la secreción de citoquinas por las células T 20 horas después mediante ELISA. Las células T reconocieron específicamente células diana incubadas con las suspensiones bacterianas relevantes, pero no de control, sobre un amplio intervalo de concentraciones.

Figura 11

Identificación de un epítipo de células T en la proteína de membrana gp350.

La secuencia codificante de gp350 se digirió con enzimas de restricción de corte frecuente y se clonó en la mezcla de vectores de expresión descrita anteriormente. (A) Los cuatro grupo de proteínas de las dos placas de 96 pocillos se pulsaron en PBMC autólogas y se añadió 24 horas después el clon gp-B8 de células T específicas de gp350. Se detectó una señal de activación fuerte con la preparación de proteínas del grupo IA. (B) Se inocularon los cultivos de suspensión bacteriana de las 48 colonias de este grupo y se indujo la expresión de las proteínas mediante la adición de IPTG. Cuatro horas más tarde, se transfirieron directamente 20 μ l de cada cultivo bacteriano a pocillos separados de una placa de 96 pocillos sembrada con 5×10^5 PBCM/pocillo. Después de 24 horas de incubación, las células se irradiaron (40 Gy) y se lavaron. Posteriormente, se añadieron 1×10^5 células T por pocillo y se midió la secreción de IFN γ por las células T mediante ELISA. Se identificó una sola colonia bacteriana A8 que expresaba un fragmento de 152 pb de gp350 en el marco con la etiqueta de His y con GFP.

Figura 12

Placa de ensayo DANI #2, 60cfu/pocillo cribado con el clon C1-9 de células T. En este ejemplo, el clon de células T no reconoció ninguna de las proteínas expresadas en los grupos bacterianos de la placa #2. Dado que las células T secretan citoquinas sólo en respuesta al reconocimiento de antígenos, no se detectó ninguna señal específica por encima de la señal base.

Figura 13

Placa de ensayo DAN1 #3 con 60cfu/pocillo y células T C1-9. El pocillo E3 de la placa #3 indujo la secreción de GM-CSF por las células T.

Figura 14

Prueba de colonias bacterianas individuales del grupo positivo 3/E3 con células T C1-9. De las 96 colonias bacterianas individuales analizadas, seis fueron reconocidas por el clon C1-9 de células T.

Ejemplos:

Ejemplo 1:

[0048] En este ejemplo, se utiliza CAT como marcador en la proteína de fusión.

Generación del sistema de vectores de expresión

[0049] A efectos de crear un sistema de vectores de expresión, se insertó la secuencia codificante del gen de la cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) en dirección 3' del promotor inducible por IPTG en el plásmido pTrcHisA (Invitrogen), fusionando una etiqueta de histidina (His) y el epítipo del anticuerpo AntiXpress al extremo N-terminal de CAT. Las proteínas de fusión resultantes se podrían purificar sobre columnas de níquel y la expresión se podría monitorizar mediante transferencia Western. Para la inserción de fragmentos antigénicos, se introdujo un sitio de clonación múltiple (MSC) en dirección 5' del marco de lectura abierto (ORF) de CAT. El MSC contiene sitios de reconocimiento únicos para cuatro endonucleasas de restricción de extremos romos, con la primera (StuI) y las últimas tres (MscI, Eco47III y SnaBI), separadas por codones de parada en los tres marcos de lectura para evitar la expresión de CAT de los plásmidos no recombinantes (figura 1A). Los sitios de restricción MscI, Eco47III y SnaBI son parcialmente solapantes, cortando el ADN en tres posiciones diferentes del marco de lectura. A partir de este vector denominado F315A, se crearon dos versiones adicionales F315B y F315C, que difieren de la versión F315A parental en uno o dos nucleótidos insertados delante del MSC. De este modo, al cortar los vectores F315A, -B y -C con StuI, se puede insertar cualquier fragmento de ADN en el marco con el ORF en dirección 5' que codifica la etiqueta de His y el epítipo del anticuerpo. La restricción adicional de la mezcla de vectores con MscI, Eco47III o SnaBI, permite la inserción de cualquier fragmento de ADN en el marco con ORF de CAT en dirección 3' (figura 1A). Para analizar si las fusiones N-terminales de CAT interferirían con la expresión y función de las proteínas mediante la interferencia con un plegamiento correcto de las proteínas, se insertaron fragmentos génicos de longitud variable en el marco con CAT, y se analizó el crecimiento de las bacterias transformadas en placas agar que contenía cloramfenicol. La inserción de los fragmentos que codifican más de 100 aminoácidos delante de CAT no anuló la resistencia a cloramfenicol (datos no mostrados). A efectos de analizar si diferentes proteínas de fusión antígeno-CAT se expresaban a niveles similares, y si las colonias bacterianas que expresaban las proteínas de fusión antígeno-CAT en el marco se podían seleccionar con cloramfenicol, se unieron al azar fragmentos de ADNc de extremos romos unidos generados a partir de ADNc de una línea de células B humanas en la mezcla de vectores. Tras la transformación, las bacterias se emplacaron en placas de agar que contenían cloramfenicol e IPTG y se utilizaron trece colonias bacterianas crecientes elegidas al azar para el análisis posterior. Se extrajeron los

plásmidos de estas colonias y se secuenciaron las inserciones. Estos experimentos mostraron que el tamaño de las inserciones variaba 27-159 pb. De forma destacada, ninguna de las bacterias contenía vector religado sin inserción, y todas excepto la colonia #6 expresaban proteínas de fusión que consistían en una etiqueta de His N-terminal, el fragmento de péptido insertado y CAT. En paralelo, los lisados bacterianos de las colonias se separaron mediante SDS-PAGE y las proteínas se tiñeron con colorante CoomassieR, o análisis mediante transferencia Western utilizando el anticuerpo AntiXpress (Invitrogen). Como ya es evidente a partir de la tinción con Coomassie, todas las proteínas de expresión se expresaron a niveles similares y muy elevados que comprendían hasta un 50% del lisado de proteína (figura 1 B). De forma destacada, la colonia #6 expresó una proteína de fusión que carecía de la etiqueta de His y el epítipo del anticuerpo. La traducción de esta proteína se inició en un AG interno en el fragmento de ADNc insertado. En consecuencia, esta proteína permaneció sin detectar en los experimentos de transferencia Western con el anticuerpo AntiXpress (figura 1B).

Eficacia de la presentación de antígenos

[0050] En nuestros experimentos previos de presentación de antígenos, se observó que las APC humanas (LCL y PBMC) presentan de forma eficaz antígenos expresados en bacterias en MHC II. Adicionalmente, se demostró que las células T reconocían específicamente células diana incubadas con suspensiones bacterianas sobre un intervalo amplio de concentraciones. Para evaluar la sensibilidad de esta estrategia de identificación de antígenos, se incubaron LCL con cantidades crecientes de bacterias que expresaban en epítipo M1 de la gripe fusionado a CAT, y, después de un periodo de incubación de 24 horas, se sondaron las células con el clon M1-E5 de células T CD4+ específicas de M1 (Nimmerjahn et al., 2003). Para determinar la eficacia de la presentación de antígenos, se purificó la proteína de fusión M1-CAT de los cultivos bacterianos sobre columnas de níquel, y se incubó LCL con cantidades crecientes de proteínas en paralelo. Para simular las condiciones de cribado, se diluyeron la proteína purificada y la suspensión bacteriana en proteína irrelevante y los cultivos bacterianos hasta una concentración final de 500 µg/ml de proteína y 10^{10} bacterias/ml, respectivamente. Se añadieron cantidades constantes de estas mezclas (10 µl) a 1×10^5 LCL autólogas en 200 µl de medio LCL suplementado con 100 µg/ml de gentamicina para terminar el crecimiento bacteriano. Después de 24 horas de incubación, se extrajeron 100 µl de medio y 100 µl de medio de células T que contenía 1×10^5 células T M1 E5 CD4+ añadidas y se determinó la secreción de citoquinas por las células T 20 horas más tarde. Las células T reconocieron LC incubados con bacterias enteras o proteína purificada sobre un amplio intervalo de concentraciones y con una eficacia similar incluso cuando se diluían 1:500 (figura 2). Estos experimentos mostraron que los antígenos se detectan de manera eficaz en grupos grandes y sugirieron que se pueden identificar antígenos desconocidos con esta estrategia.

Localización ("mapping") directa de epítipos en antígenos modelo

[0051] En un primer grupo de experimentos se buscó aplicar este método para definir los epítipos de células T auxiliares en antígenos conocidos. Se habían establecido en nuestro grupo dos clones de células T CD4+ específicas para la proteína BRLF1 de EBV denominados 3A10 y 1H3, y un clon específico para la proteína BALF4 (clon B5) mediante la estimulación de PBMC de donantes sanos infectados con EBV en incubación con proteínas BRLF1 y BALF4 recombinantes purificadas (Adhikary et al., apartado). La secuencia codificante de estos dos antígenos se digirió con una enzima de restricción de corte frecuente o una combinación de las mismas, los fragmentos cortos de ADN resultantes se trataron con T4 polimerasa para generar extremos romos y se unieron en una mezcla de vectores F315A, -B, y -C digeridos con *Stu*I y adicionalmente con *Msc*I, *Sna*BI, o *Eco*47III. Tras la transformación, las bacterias se incubaron en placas de microtitulación de 96 pocillos en un medio de supercaldo que contenía IPTG y cloramfenicol para seleccionar los recombinantes que expresan las proteínas de fusión antígeno-CAT. Se determinó el número de unidades formadoras de colonias bacterianas (cfu) por pocillo en paralelo mediante el emplacado de alícuotas de las bacterias transformadas en placas de agar que contenían IPTG y cloramfenicol. Estos experimentos revelaron que los cultivos líquidos se inocularon con 14 cfu/pocillo en el caso de antígeno de BALF4 y 60 cfu/pocillo en el caso de BRLF1. El día siguiente, las bacterias se transfirieron en bloques de pocillos profundos de 96 pocillos y se recogieron mediante centrifugación cuando se alcanzó una densidad óptica DO600 de 1. Las bacterias se resuspendieron en 1/5 del volumen original y de cada pocillo se añadieron 10 µl a 1×10^5 LCL en 200 µl de medio LCL por pocillo de una placa de microtitulación. Después de incubación durante la noche, se añadieron 1×10^5 células T y se determinó la secreción de citoquinas 24 horas después. Tal como se muestra en la figura 3, cinco grupos fueron reconocidos por el clon B5 de células T específicas de BALF4. En el caso de BRLF1, el clon 3A10 reconoció uno, mientras que el clon 1H3 reconoció diez grupos, indicando que los dos clones reconocen diferentes epítipos. Para identificar bacterias positivas individuales, los grupos positivos se emplacaron en placas de agar que contenían IPTG 1 mM y cloramfenicol 30µg/ml, y después de incubación durante la noche, se recogieron las colonias bacterianas individuales, se expandieron y se analizaron con las células T tal como se ha descrito. Se extrajeron los plásmidos de bacterias positivas y se secuenciaron las inserciones. Los cinco grupos de bacterias positivas individuales del grupo D1 analizados transportaban el mismo plásmido que codificaba un péptido BALF4 de 27 aminoácidos. La única colonia bacteriana reconocida por el clon 3A10 transportaba un fragmento de 81 pb derivado de BRLF1 que codificaba un péptido de 27 aminoácidos. Las cinco colonias

individuales derivadas del grupo H5 y reconocidas por el clon 1H3 expresaron un péptido idéntico de 19 aminoácidos de BRLF1 (figura 3). Para localizar con precisión los epítomos de células T, se utilizaron adaptadores sintéticos que abarcan partes solapantes de los péptidos identificados esencialmente tal como se ha descrito en el ensayo DEPI.

5 Identificación de antígenos de EBV desconocidos en una biblioteca de expresión de EBV

[0052] Estos datos sugieren que se podrían identificar antígenos desconocidos en bibliotecas más complejas. Se habían establecido en nuestro grupo clones de células T específicas para EBV mediante la estimulación repetida de células T CD4+ con LCL autólogas, pero la especificidad de estos clones permanecía desconocida. Por lo tanto, en un segundo grupo de experimentos, se analizó si este método se podía utilizar para identificar antígenos virales desconocidos. Se aisló el ADN genómico de EBV y se digirió el ADN con enzimas de restricción de corte frecuente. Los fragmentos cortos de ADN resultantes se unieron al azar en un sistema de vectores de selección de CAT tal como se ha descrito. Con un tamaño promedio de inserción de 82 pb en los experimentos previos y un tamaño de genoma de 182 kb, una placa de 96 pocillos sembrada con 60cfu/pocillo cubriría 2,5 veces todos el genoma de EBV. Por lo tanto, se buscó identificar los antígenos reconocidos por los clones G11-3 y F7 de células T específicas de EBV mediante el emplacado de la biblioteca de EBV a 60 cfu/pocillo en una placa de 96 pocillos. Tal como se muestra en la figura 4, ambos clones reconocieron un único grupo bacteriano, pero diferente. Todas las colonias bacterianas positivas individuales reconocidas por el clon F7 de células T transportaban un plásmido con un fragmento de 66 pb del gen de BALF4 expresado en el marco con la etiqueta de His y CAT. Utilizando adaptadores sintéticos, la secuencia central del epítipo se definió posteriormente como AA₅₇₅₋₅₈₉DNEIFLTkKNITEVCQ. El clon G11-3 sólo reconoció una colonia de bacterias individuales que transportaban un plásmido que contenía un fragmento de 147 pb del gen de BNRF1. La secuencia central del epítipo se definió en experimentos posteriores como AA₁₂₃₈₋₁₂₅₂TDawRFAMNYPRNPT. Estos resultados demostraron que antígenos virales desconocidos se pueden identificar con este método.

25 Reconocimiento eficaz de bacterias que expresan proteínas de fusión antígeno-CAT pero no antígenos completos

[0053] La expresión bacteriana de los ADNc completos se ha aplicado satisfactoriamente para identificar un antígeno menor de histocompatibilidad murino limitado por MHC II. Para comparar la eficacia y la sensibilidad de las dos estrategias, se buscó comparar el reconocimiento por células T de varios antígenos expresados como proteínas de longitud completa o como proteínas de fusión antigénicas cortas descritas aquí. Por lo tanto, el ORF de las proteínas de EBV BALF4, BRLF1, EBNA3A, la proteína de matriz M1 de la gripe y NeoR se expresaron en el marco con la etiqueta de His en dirección 5' en el vector de pTrcHis. Las colonias bacterianas individuales transformadas con los plásmidos se utilizaron para inocular 400 ml de cultivos de supercaldo, y se indujo la inducción de proteínas cuando las suspensiones bacterianas alcanzaron una DO600 de 0,8. Cuatro horas más tarde, se recogieron las bacterias mediante centrifugación y se resuspendieron a una densidad óptica DO600 de 5. Se añadieron varias diluciones de esta suspensión a 1×10^5 APC y posteriormente se sondaron con células T específicas de antígeno. En paralelo, la proteína se purificó del resto de cultivos y se analizó mediante transferencia Western utilizando el anticuerpo AntiXpress. Tal como se muestra en la figura 5, todas las bacterias que expresaban las proteínas de fusión antígeno-CAT se reconocieron de forma eficaz sobre un amplio intervalo de concentraciones. De las bacterias transformadas con los plásmidos que expresaban los ADNc completos, sólo las bacterias transformadas con los plásmidos de expresión de M1 de gripe y NeoR fueron reconocidas por las células T, pero en un grado mucho menor que las construcciones de fusión. Las bacterias transformadas con plásmidos que codificaban las proteínas BALF4, BRLF1 y EBNA3A de EBV no fueron reconocidas. Estos resultados se correlacionan con una expresión baja o no detectable de las proteínas mediante transferencia Western (datos no mostrados) y demostraron que los antígenos se detectan de manera eficaz con este método incluso cuando derivan de proteínas que se expresan muy poco en bacterias.

[0054] Debido a que las células auxiliares T juegan un papel crucial en la orquestación de respuestas inmunes adaptativas, la identificación de antígenos reconocidos por células T CD4+ es importante para entender y aumentar las respuestas específicas de antígenos. Aquí, se adaptó nuestro ensayo DEPI (identificación directa de epítipo) desarrollado previamente a la identificación de antígenos desconocidos. El método DANI (identificación directa de antígeno) se basa en la expresión de pequeños fragmentos de ADN fusionados a CAT en bacterias. Las bacterias que expresaban el fragmento antigénico en el marco con CAT se seleccionan con cloramfenicol y se añaden directamente a cultivos de LCL que presentan de manera eficaz péptidos derivados de proteínas expresadas bacteriamente en MHC II.

[0055] El análisis de colonias de bacterias individuales seleccionadas con cloramfenicol demostraron que todas las proteínas de fusión se expresaron a un nivel elevado, que comprende hasta un 50% del lisado total de bacterias. Mediante el análisis de un gran número de colonias nunca se hallaron colonias bacterianas que transportaban vector religado. Además, no se detectaron inserciones más cortas de 25 pb aunque dichos fragmentos deben haberse generado mediante la digestión con enzimas de restricción. Probablemente, estos fragmentos que codificarían epítomos de la clase II incompletos se perdieron durante el proceso de preparación del ADN que

complica extracciones con fenol/cloroformo y precipitaciones con etanol. Los fragmentos mayores de 300 pb tampoco se detectaron porque la eficacia de unión disminuye con el tamaño de la inserción o las inserciones más grandes afectan a la función de CAT, por ejemplo, interfiriendo con el plegado de las proteínas. En casi todas las colonias, las inserciones se expresaron en el marco con la etiqueta de His en dirección 5' y el ORF de CAT en dirección 3'. En un caso, la inserción no se expresó en el marco con la etiqueta de His en dirección 5', pero debido al inicio de la traducción de un ATG interno, la inserción estaba en el marco con CAT, confirmando la selección elevada de manera eficaz del sistema de vectores.

[0056] Utilizando enzimas de restricción de corte frecuente se generaron fragmentos pequeños de ADN que codificaban péptidos de 10-30 aminoácidos, la longitud habitual de los péptidos presentados en las moléculas de MHC de clase II. El tamaño de los fragmentos de ADN generados depende de las endonucleasas de restricción utilizadas. La separación del ADN en fragmentos pequeños conlleva intrínsecamente el riesgo de la destrucción de los epítomos. De este modo, se utilizaron diferentes enzimas de restricción de corte frecuente, solas o combinadas, para separar el ADN parcialmente y hasta completar. Debido a que los fragmentos de ADN de extremos romos se unen al vector, el fragmento antigénico se puede expresar en cualquiera de los seis marcos de lectura posibles (sentido y antisentido). De este modo, 5/6 de las bacterias deberían expresar proteínas irrelevantes. Sin embargo, el código genético utiliza 64 codones que incluyen tres codones de parada. De este modo, a excepción del ORF natural, los fragmentos traducidos en marcos de lectura irrelevantes deberían terminar estadísticamente después de 64 pb. En el análisis de secuencia descrito aquí, no se hallaron colonias que expresaran proteínas de fusión en que la inserción se expresara en un marco de lectura irrelevante. En experimentos adicionales realizados mientras tanto, se hallaron dichas colonias aunque a una frecuencia inferior. El número depende fuertemente del tamaño promedio de la inserción. Cuanto más cortas son las inserciones de ADN, más elevado es el número de colonias que expresan inserciones en marcos de lectura irrelevantes. Por otro lado, al aumentar el tamaño de la inserción se mantiene el riesgo de interferencia con la función de CAT o la reducción en los niveles de proteína. Para nuestra experiencia, un tamaño promedio de inserción de aproximadamente 90 pb se ajusta mejor para identificar antígenos con esta estrategia.

[0057] Como APC para la presentación de péptidos derivados de proteínas expresadas bacteriamente en MHC II, se utilizaron LCL. LCL expresan niveles elevados de moléculas de MHC clase II y se pueden obtener de muestras pequeñas de sangre. Utilizando LCL autólogas como APC también ofrece la ventaja de que no se requiere el conocimiento de la molécula de restricción. LCL ingiere de manera eficaz y presenta el antígeno expresado en las bacterias intactas completas, conduciendo al reconocimiento por células T incluso cuando se diluyeron 1:500 en bacterias irrelevantes. En los experimentos descritos, se han elegido tamaños de grupos más conservativos, en primer lugar porque con un tamaño de grupo de 60 cfu/pocillo el genoma completo de EBV se cubre más de dos veces en una placa de 96 pocillos y tamaños de grupos más grandes requerirían un análisis de un mayor número de colonias individuales de grupos positivos. Debido a la elevada sensibilidad del método, se pueden utilizar tamaños de grupos mucho más grandes cuando se criban bibliotecas más complejas.

[0058] Aunque se ha descrito la identificación de los antígenos limitados por MHC de clase II mediante expresión bacteriana de ADNc (Sahara y Shastri, 2003), el nivel de expresión de proteínas eucariotas en bacterias puede variar en varios órdenes de magnitud, haciendo que sea difícil establecer los tamaños de grupo representativos. Mientras que se pueden utilizar de forma satisfactoria tamaños de grupo grandes para identificar antígenos altamente expresado, la identificación de la mayoría de antígenos requerirá tamaños de grupo más pequeños. En nuestros experimentos, varios antígenos permanecieron sin detectar incluso cuando se utilizaron bacterias sin diluir, implicando que algunos antígenos permanecerán sin descubrirse con este método.

[0059] En el ensayo DANI descrito aquí, todos los fragmentos antigénicos se expresan igualmente bien en bacterias, independientemente de la proteína de la que derivan. De este modo, se pueden establecer tamaños de grupo representativos para todos los antígenos. Además, se pueden utilizar repetidamente bibliotecas de expresión congeladas. Además, el tamaño pequeño de los péptidos antigénicos facilita ampliamente la definición de los epítomos de células T. Esta alta sensibilidad y simplicidad indican que este método se puede utilizar no sólo para la identificación de antígenos bacterianos o virales, sino que también se puede aplicar para identificar antígenos en bibliotecas de ADNc complejas.

55 **Materiales y métodos**

Cepa y cultivo bacteriano

[0060] La cepa de *Escherichia coli* XL-1 Blue MRF' (Stratagene) se utilizó en todos los experimentos descritos. Las bacterias se cultivaron en un incubador bacteriano o, como cultivos líquidos, en un agitador bacteriano a 37°C. Para la selección se utilizaron concentraciones apropiadas de antibióticos (100 µg/ml ampicilina, 15 µg/ml tetraciclina y 30 µg/ml cloramfenicol). Para el almacenamiento a largo plazo de las bacterias, se añadió glicerol a cultivos bacterianos

densos hasta una concentración final del 20% y se almacenó a -80°C . La expresión de proteínas se indujo mediante la adición de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1mM.

Construcción del vector de expresión

[0061] Se realizaron todas las manipulaciones de ADN según procedimientos estándar (Sambrook et al., 2001). Para generar un vector de expresión que permitiera la inserción de fragmentos antigénicos entre la etiqueta de His en el extremo amino y la CAT en el extremo carboxilo, se clonó en primer lugar el marco de lectura abierto de CAT en los sitios BamHI-HindIII del vector de expresión bacteriana pTrcHisA (Invitrogen) para producir el plásmido CAT-pTrcHisA. Utilizando mutagénesis dirigida de sitio, el sitio MscI en el ORF de CAT se destruyó sin alterar la secuencia de aminoácidos, produciendo el plásmido CAT-pTrcHisA^ΔMsc. En este plásmido, se introdujo inmediatamente un sitio de clonación múltiple en dirección 5' del ORF de CAT mediante la inserción de un adaptador de ADN en el único sitio de restricción BamHI, dando lugar al plásmido F315A (oligo F315 sentido: GATCCGAGCTCGAGGCCTAATTAGCTGATGGCCAGCGCTACGTACCG; oligo F315 antisentido: GATCCGGTACGTAGCGCTGGCCATCAGCTAATTAGGCCTCGAGCTCG). Este plásmido se cortó con XhoI y parcialmente con BamHI. Se insertaron dos adaptadores diferentes en este plásmido, causando un desplazamiento en el marco de lectura en las posiciones +1 ó +2 (figura 1). Estas dos versiones adicionales del vector se designaron como F315B y F315C. Los adaptadores se prepararon mezclando cantidades equimolares (100 pmol/ μl) de oligonucleótidos de sentido y antisentido. Para formar adaptadores de doble cadena, la mezcla se calentó hasta 95°C durante 5 min, y a continuación se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente. A continuación, se unió 1 μl de adaptador hibridado con 300 ng de vector digerido con las enzimas de restricción indicadas. La integridad de todos los plásmidos se verificó mediante la digestión con enzimas de restricción y en análisis de secuencia de las regiones modificadas.

[0062] Para la inserción de fragmentos de ADN antigénicos en el vector de expresión, se mezclaron cantidades iguales de los plásmidos G315A, B y C y se cortaron con StuI. Después de la extracción con fenol/cloroformo los plásmidos linealizados se dividieron en tres muestras que a continuación se digirieron con MscI, Eco47III, o SnaBI, y se trataron con CIP para evitar que se vuelva a unir el vector. Después del tratamiento con fenol/cloroformo, el ADN vector se separó en un gel de agarosa y se purificó utilizando el kit de extracción en gel Qiaex II (Qiagen).

Generación de biblioteca de expresión

[0063] Los marcos de lectura abiertos que codifican BRLF1 y BALF4 se digirieron con cortadores frecuentes elegidos y si es necesario se trataron con T4 polimerasa para formar extremos romos. Se purificó el ADN de fagos λ utilizando el kit Lambda Maxi según las directrices del fabricante (Qiagen). La bibliotecas de fagos λ de células B se generó previamente en nuestro laboratorio utilizando el kit de clonación λ ZAPII cDNA Gold (Stratagene). Se obtuvo el ADN de EBV según el protocolo descrito en <http://haema145.gsf.de/ham/medpre.htm>. Brevemente, se centrifugaron durante 10 minutos a temperatura ambiente a 5000xg 6x400 ml de cultivos bacterianos densos, transformados con p2089, un plásmido derivado del factor F que contenía el genoma de EBV completo. La lisis de las bacterias y las preparaciones de ADN se realizaron mediante el método de lisis alcalina (Sambrook et al., 2001). El ADN purificado se disolvió en 5 ml de tampón TE especial (Tris 50M pH 8,0, EDTA 20 mM) al que se añadieron 6,0 g de cloruro de cesio sólido (CsCl) y se disolvieron. Después de la adición de 0,5 ml de bromuro de etidio (EtBr) (10 mg/ml), se llenó un tubo Ultra-crimp Kendo de 11 ml con solución. El tubo se centrifugó en un rotor Beckman 70.1 TI rotor a 147.000xg a 20°C durante 48 horas. Se recogieron dos bandas claramente visibles utilizando una jeringa de 5 ml y una aguja de 1 mm de diámetro (20G). La alícuota recogida se transfirió a un nuevo tubo de ultracentrífuga de 11 ml relleno con una solución de CsCl 1,55 g/ml y se centrifugó de nuevo a 147.000xg a 20°C durante 48 horas. El ADN se recogió de nuevo utilizando una jeringa de 5 ml y se extrajo el EtBr utilizando isopropanol saturado en agua y CsCl. El ADN de EBV se precipitó utilizando isopropanol y se disolvió en un tampón 1 x TE. Después de la digestión del ADN con enzimas de restricción de corte frecuente y el tratamiento con T4 polimerasa para generar extremos romos, el ADN se extrajo con fenol/cloroformo y la concentración se determinó mediante la dispersión de diluciones en serie del ADN sobre una placa de agarosa con EtBr junto con ADN de concentraciones conocidas y la comparación de la intensidad de fluorescencia bajo luz UV. Las enzimas de restricción de corte frecuente utilizadas en este estudio fueron: Acil, CviJI*, y MnlI (todas de Biolabs excepto CviJI* de EurX). Se unieron 100 ng de este ADN digerido durante la noche a 16°C a 300 ng de vector de expresión en un volumen total de 10 μl . Para determinar la eficacia de unión y transformación, se utilizó 1 μl de la reacción de unión para transformar XL1-Blue MRF⁺ y se contó el número de colonias crecientes en placas de LB agar que contenían IPTG 1 mM y cloramfenicol 30 $\mu\text{g/ml}$. Para la generación de bibliotecas, se utilizaron los números indicados de cfu para inocular cultivos líquidos de medio de supercaldo que contenía IPTG 1 mM y cloramfenicol 30 $\mu\text{g/ml}$ en placas de 96 pocillos. Después de cultivo durante la noche, se transfirieron 100 μl de suspensión bacteriana de cada pocillo a 1,5 ml de medio de supercaldo/pocillo que contenía IPTG 1 mM y cloramfenicol 30 $\mu\text{g/ml}$ en una placa de 96 pocillos profundos (Pecolab). Al resto del cultivo bacteriano en placas de microtitulación, se añadieron 100 μl de medio de supercaldo que contenía glicerol al 40% y las placas se congelaron como placas madre -80°C . Los grupos

bacterianos en placas de pocillos profundos se incubaron bajo agitación vigorosa a 37°C en un agitador bacteriano. Cuando la densidad óptica de los pocillos alcanzó una DO600 de 1, se recogieron las bacterias mediante centrifugación (3000 rpm durante 15 min) y el residuo se resuspendió en 300 µl de medio. Se añadieron 10 µl de estas suspensiones bacterianas a 1×10^5 APC en 200 µl de medio/pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después de 24 horas de incubación, se descartaron 100 µl de medio y se añadieron 1×10^5 células T CD4+ específicas/pocillo en 100 µl de medio de células T que contenía 100 µg/ml de gentamicina. Se midió la secreción de GM-CSF después del reconocimiento específico 24 horas más tarde mediante un ensayo ELISA utilizando 100 µl de sobrenadante.

10 **[0064]** El número mínimo de colonias a cribar se calculó dependiendo del número de sitios de restricción en el marco de lectura abierto del antígeno. Por ejemplo, el ORF de BRLF1 tiene 1818 pb. La digestión completa de la secuencia codificante con la enzima de restricción CviJI* genera 57 fragmentos. Debido a que los fragmentos de ADN se pueden insertar en cualquier orientación, un fragmento determinado se puede expresar como proteínas de fusión de CAT etiquetadas con His en seis marcos de lectura diferentes. De este modo, el número mínimo de colonias a recoger es de 57x6. Debido a que la inserción de un fragmento en un marco de lectura irrelevante puede causar la terminación de la traducción, el número real resultó ser mucho menor. Además, el ADN se digirió hasta completar o parcialmente con combinaciones de enzimas.

Expresión y purificación de proteínas

20 **[0065]** Para aislar proteínas expresadas bacterianas, las bacterias se incubaron en medio de supercaldo que contenía IPTG 1 mM y cloramfenicol 30 µg/ml bajo agitación vigorosa a 37°C en un agitador bacteriano. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica DO600 de 0,8, las bacterias se centrifugaron (3000xg/15min) y el residuo se resuspendió en 50 ml de tampón de lisis (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM, urea 8 M, imidazol 10 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 8,0). Después de la centrifugación (5000xg/15min) para agrupar los residuos bacterianos insolubles, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 300 µl de agarosa Níquel-NTA (Qiagen). Las proteínas etiquetadas con His se dejaron unir a la agarosa recubierta de níquel mediante incubación durante la noche a 4°C bajo agitación constante. El día siguiente, las perlas de agarosa Níquel-NTA se agruparon mediante centrifugación (2000xg/10min), y se lavaron una vez con tampón de lisis. Para eluir las proteínas, las perlas se incubaron tres veces con 300 µl de tampón de elución (tampón de lisis con imidazol 500 mM, pH 7,5) y el sobrenadante que contenía proteína se recogió después de cada etapa de incubación mediante centrifugación (10.000xg/3 min). El eluato recogido se dializó contra PBS durante dos días. Se añadieron 10 µl de esta solución de proteínas, que contenía habitualmente 500 µg/ml de proteína, a APC en 200 µl en un pocillo de una placa de microtitulación. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se analizó la identidad y pureza mediante tinción con Coomassie y mediante transferencia Western utilizando el anticuerpo AntiXpress (Invitrogen) y el sistema de detección ECL plus (Amersham Biosciences).

Aislamiento y cultivo de clones de células T

40 **[0066]** La generación de líneas de células T específicas y el aislamiento y expansión de clones de células T CD4+ se han descrito previamente (Mautner et al., 2004). Se utilizaron en este estudio los siguientes clones de células auxiliares T: MI-E5 que reconoce M1 AA234-248-LLENLQAYQKRMGVQL de gripe. En el presente trabajo se reconocieron los epítomos reconocidos por los clones 3A10 y 1H3 de células T específicas de BRLF-1. Los clones G11-3 y F7 se aislaron de líneas de células T específicas de EBV generadas mediante la estimulación repetida de células T CD4+ de sangre periférica con LCL autólogas. Los ensayos de secreción de citoquinas se realizaron tal como se ha descrito (Mautner et al., 2004). Brevemente, se sembraron 1×10^5 LCL o 5×10^5 PBMC por pocillo de una placa de base plana de 96 pocillos en 200 µl de medio LCL (RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales al 1%, piruvato sódico 1mM, gentamicina 100 µg/ml, FCS al 10%). Las células se incubaron durante 24 horas con proteínas purificadas o las bacterias completas. Al final del periodo de incubación, se extrajeron 100 µl de sobrenadante y se añadieron 1×10^5 células T en 100 µl de medio de LCL. Se midió la secreción de citoquinas por las células T 20 horas después mediante ELISA (R&D Systems).

Análisis de colonias bacterianas positivas

55 **[0067]** Se desarrollaron colonias bacterianas positivas individuales durante la noche y se aisló el ADN plasmídico según las directrices del fabricante (Qiagen). El ADN plasmídico se secuenció utilizando el cebado directo pTrcHis (GAGGTATATTAATGTATCG).

Ejemplo 2:

60 **[0068]** Este ejemplo se refiere a la expresión de una proteína de fusión en la que se utiliza la GFP como marcador.

Diseño del vector de expresión

[0069] En estudios previos se había localizado epítomos en los antígenos reconocidos por células T CD4+ específicas del virus de Epstein-Barr mediante la expresión de construcciones de delección de los antígenos en bacterias. Después de la purificación de proteínas, los fragmentos de antígeno se suministraron a las células presentadoras de antígenos, que a continuación se sondaron con las células T específicas de antígeno. Aquellas proteínas que aún contenían el epítipo se identificaron mediante la medición de la secreción de citoquinas de las células T y posteriormente se recortaron y se analizaron de la misma manera (Mautner et al., 2004). Este procedimiento finalmente afrontó el problema de que las proteínas pequeñas son inestables y de este modo dificultan su expresión en bacterias. Por lo tanto, se fusionaron fragmentos de antígeno pequeños con la proteína verde fluorescente (GFP) que se expresa de manera eficaz en bacterias. Además, las colonias bacterianas que expresan proteínas de fusión antígeno-GFP aparecen verdes, lo cual facilita ampliamente la identificación de recombinantes bacterianos. Estos experimentos sugirieron que los epítomos se pueden identificar directamente mediante el cribado de las bibliotecas de expresión de antígeno-GFP creadas mediante la fusión aleatoria de fragmentos de antígeno a GFP, y el aspecto verde de las colonias bacterianas que expresan proteínas antígeno-GFP ayudaría a reducir el esfuerzo del cribado.

[0070] A efectos de crear un plásmido que permitiría la expresión de dichas proteínas quiméricas, se insertó la secuencia codificante de GFP en dirección 3' del promotor inducible por IPTG en el plásmido pTrcHisA (Invitrogen), fusionando una etiqueta de histidina (His) y el epítipo del anticuerpo AntiXpress al extremo N-terminal de la GFP. De este modo, las proteínas de fusión resultantes se podría purificar sobre columnas de níquel y la expresión podría monitorizarse mediante transferencia Western. Entre el epítipo de anticuerpo y GFP, se insertó un adaptador de ADN que codifica un adaptador de péptido glicina-serina (G)₄-S-(G)₄-S-(G)₄ flexible (Kortt et al., 2001) destinado a evitar que secuencias de proteínas en dirección 5' interfieran con el plegado de GFP, así como un sitio de clonación múltiple (MCS) para la inserción de fragmentos de antígeno (figura 6). Este MCS introduce secuencias de reconocimiento únicas para cuatro endonucleasas de restricción de extremos romos, con el primero (StuI) y los tres últimos sitios de reconocimiento (MscI, Eco47III, SnaBI), separados por codones de parada en los tres marcos de lectura para evitar la expresión de GFP de plásmidos no recombinantes. Estos tres últimos sitios de restricción son parcialmente solapantes, cortando el ADN en tres posiciones diferentes del marco de lectura. De este vector de clonación designado como F288A, se crearon dos versiones adicionales. Los plásmidos F288B y F288C difieren de F288A sólo en uno o dos nucleótidos insertados delante del sitio de clonación múltiple, respectivamente. De este modo, al cortar el vector F288A, B o C con StuI, se puede insertar cualquier fragmento de ADN en el marco con el marco de lectura abierto en dirección 5' de la etiqueta de His y el epítipo del anticuerpo. Al digerir el vector adicionalmente con MscI, Eco47III o SnaBI, el fragmento génico también se puede insertar en el marco con el ORF en dirección 3' de GFP (Figura 6).

[0071] Para analizar este nuevo sistema de vectores de expresión, se buscó determinar el epítipo reconocido por un clon de células T CD4+ específicas de EBNA3A que se había establecido mediante la estimulación de PBMC de un donante sano infectado con EBV en incubación con proteína EBNA3A purificada (Mautner et al., aportado). La secuencia codificante del gen de EBNA3A se digirió con una enzima de restricción de corte frecuente individuales, o combinación de las mismas, los fragmentos de ADN resultantes se trataron con T4 polimerasa para generar extremos romos y se unieron al vector. Para permitir la inserción de los fragmentos génicos en todos los posibles marcos de lectura, el vector se preparó mediante la digestión de una mezcla equimolar de los plásmidos F288A, B, y C con StuI, y adicionalmente con MscI, Eco47III o SnaBI, seguido del tratamiento con fosfatasa intestinal de ternera (CIP) para evitar que se vuelva a unir el vector.

Procedimiento de cribado de la biblioteca de expresión

[0072] Después de la transformación con el ADN unido, las bacterias se emplacaron en placas de agar que contenían IPTG 1 mM para inducir la expresión de proteínas. Aproximadamente el 10% de las colonias bacterianas resultantes eran verdes (figura 7). Esto era esperado porque estadísticamente uno de cada nueve fragmentos se expresará en el marco con el ORF en dirección 5' que codifica la etiqueta de His, así como el ORF en dirección 3' que codifica GFP. Para evaluar esta predicción, se recogieron 20 colonias verdes y 20 colonias blancas y se secuenciaron las inserciones de ADN. En plásmidos extraídos de colonias verdes, las inserciones de ADN fueron todas en el marco con GFP, y a excepción de un caso, también en el marco con el ORF en dirección 5' que codifica la etiqueta de His y el epítipo del anticuerpo. En el caso excepcional, la traducción se había iniciado en un codón ATG en la inserción de ADN que estaba en el marco con GFP y produjo una proteína de fusión antígeno-GFP que carecía de la etiqueta de His en el extremo N-terminal. En cambio, ninguno de los plásmidos aislados de colonias bacterianas blancas codificaba las proteínas de fusión de antígeno etiquetado con His-GFP. Los fragmentos de ADN insertados habían desplazado el marco de lectura en todos los casos, provocando la parada prematura de la traducción en el fragmento de antígeno o en GFP. Los tamaño de las inserciones eran similares en ambos grupos y variaban entre 24 y 281 pb, dependiendo de la enzima o enzimas de restricción utilizadas para digerir el ORF del antígeno. Aunque los fragmentos de ADN más cortos que 24 pb deben haberse creado mediante la digestión con

enzimas de restricción, no se hallaron inserciones de ADN tan cortas, muy probablemente porque dichos fragmentos de ADN se perdieron durante la preparación de las inserciones que implicaban la extracción con fenol/cloroformo y la precipitación con etanol del ADN digerido. Esta pérdida fortuita de fragmentos cortos de ADN evitó la formación de colonias bacterianas verdes que expresaban fragmentos de antígeno demasiado cortos para la unión a MHC II o el reconocimiento por células T. La tinción con Coomassie® de los extractos bacterianos de colonias verdes separadas por tamaño mediante SDS-PAGE mostró que los niveles de expresión todas las proteínas de fusión verdes eran muy elevados, comprendiendo el 10-40% del lisado de proteínas (datos no mostrados). Estos resultados indicaron que la selección de colonias verdes podría reducir diez veces el esfuerzo de cribado y que el nivel uniforme y elevado de la expresión de proteínas podría facilitar el cribado de grupos de colonias bacterianas. Para definir el epítipo reconocido por el clon de células T específicas de EBNA3A, se recogieron colonias bacterianas individuales verdes y se transfirieron a pocillos separados de una placa de 96 pocillos en medio LB. Después de incubación durante la noche, se combinaron alícuotas de 48 pocillos y se indujo la expresión proteínas mediante la adición de IPTG cuando la suspensión bacteriana alcanzó una densidad óptica DO600 de 0,8, mientras que las suspensiones bacterianas restantes en las placas de 96 pocillos se congelaron como las denominadas "placas madre". Se inocularon un total de cinco placas de 96 pocillos con bacterias transformadas con el vector de expresión que transportaba fragmentos de ADN de EBNA3A. Las proteínas de diez grupos se purificaron sobre partículas de níquel y se suministraron a PBMC o la línea de células B linfoblastoides (LCL) establecidas del donante, de quién derivaba el clon de células T CD4+ específicas de EBNA3A. 24 horas más tarde, se añadió el clon de células T específicas de EBNA3A y se determinó la secreción de citoquinas por las células T 20 horas más tarde mediante ELISA. Tal como se muestra en la figura 8A, se reconocieron seis grupos de proteínas cada uno derivado de 48 colonias verdes, mientras que cuatro grupos no. Para identificar bacterias positivas individuales, se cribaron las 96 colonias individuales de la placa principal I de las que derivaban dos grupos positivos. Dos proteínas purificadas de los pocillos D1 y E5 fueron reconocidas por las células T (figura 8B). La secuenciación de las inserciones de ADN reveló que el plásmido de la colonia D1 contenía un fragmento que codificaba 16 aminoácidos (aa) de EBNA3A, mientras que el plásmido de la colonia E5 transportaba una inserción de ADN que codificaba 23 aminoácidos de EBNA3A. Ambos fragmentos se solapaban en 16 aminoácidos y ambos expresaban los fragmentos en el marco de lectura con la etiqueta de His y con la GFP (figura 8C). El epítipo de células T se verificó con un péptido sintético que cubría el solapamiento. Estos resultados demostraron que esta estrategia de expresión aleatoria se puede utilizar para la localización directa de epítipos.

Definición de las secuencias centrales de epítipo utilizando adaptadores de ADN

[0073] La identificación satisfactoria de epítipos de células T auxiliares mediante la expresión de proteínas de fusión antígeno-GFP sugirió que este método se podía aplicar también a la localización de secuencias centrales de epítipo de manera más precisa y para definir los aminoácidos críticos para el reconocimiento de células T o la unión a MHC. Para evaluar esta idea, se sintetizaron adaptadores de ADN que codificaban varias partes del epítipo de EBNA3A. Para facilitar la unión de los adaptadores en el vector de expresión, se sintetizaron dos oligonucleótidos complementarios que, después de la hibridación, generaron extremos cohesivos para la unión en el vector de expresión digerido con los contadores individuales XhoI y AgeI. Los sitios de reconocimiento único de estas dos enzimas flanquean el MCS (figura 6). Después de la transformación bacteriana, se recogieron varias colonias verdes y se secuenciaron las inserciones de plásmidos. Todos los plásmidos transportaban los adaptadores sintéticos en el marco con la etiqueta de His y la GFP. Se expresaron las proteínas y se analizaron en ensayos de células T (figura 9). Utilizando esta estrategia, se definió que la secuencia central del epítipo reconocida por el clon de células T comprendía nueve aminoácidos. Truncamientos adicionales de esta secuencia central anulaban el reconocimiento por las células T, muy probablemente debido se vieron afectados los residuos de anclaje cruciales para la unión a MHC. De este modo, con este método se pueden definir los aminoácidos esenciales para la unión a MHC y/o el reconocimiento por células T.

Localización de epítipos utilizando bacterias completas

[0074] Para simplificar adicionalmente el método, se evaluó si se podía obviar el procedimiento de purificación de proteínas para identificar colonias bacterianas positivas mediante la disposición de bacterias inducidas por IPTG a células presentadoras de antígenos. Sahara y Shastri (2003) habían demostrado que las células dendríticas de ratón podían ingerir de manera eficaz bacterias completas y presentar los antígenos expresados bacteriamente en MHC de clase II. Para evaluar si las APC humanas utilizadas en este estudio (LCL y PBMC) podían presentar antígenos de bacterias completas con una eficacia similar, se realizaron experimentos de presentación de antígenos utilizando cultivos líquidos de bacterias transformadas con plásmidos que codificaban epítipos de células T auxiliares definidos. Además de las células T específicas de EBNA3A, se incluyeron en este análisis el clon M1-E5 de células T específicas de M1 de la gripe y bacterias transformadas con el plásmido F216 que expresaba el epítipo M1 fusionado a GFP (Nimmerjahn et al. 2003). La expresión de las proteínas se indujo mediante la adición de IPTG cuando las suspensiones bacterianas alcanzaron una densidad óptica DO600 de 0,8. Los cultivos bacterianos se recogieron cuatro horas más tarde mediante centrifugación y el residuo bacteriano se resuspendió en medio LB

hasta una DO600 de 5. 10 μ l de dicha suspensión bacteriana contenían 10^8 bacterias. En experimentos de titulación, se añadieron diferentes cantidades de las suspensiones bacterianas a 1×10^5 LCL autólogas o 5×10^5 PBMC en 200 μ l de medio LCL suplementado con 50 μ g/ml de gentamicina para terminar el crecimiento bacteriano. Después de 24 horas de incubación, se extrajeron 100 μ l de medio y se añadieron 100 μ l de medio de LCL que contenía 1×10^5 células T CD4+ añadidas y se determinó la secreción de citoquinas por las células T 20 horas más tarde. Ambos tipos de APC presentaron de manera eficaz el antígeno de las bacterias completas (figura 9). A diferencia de LCL, las PBMC secretaron cantidades variantes de citoquinas cuando se cocultivaron con bacterias. Por lo tanto, se irradiaron las PBMC (40 Gy) y se lavaron antes de la adición de las células T. De manera destacada, las células T reconocieron específicamente células diana incubadas con suspensiones bacterianas sobre un amplio intervalo de concentraciones. De este modo, las fluctuaciones en la velocidad de crecimiento de suspensiones bacterianas individuales en placas de 96 pocillos no deberían afectar a la sensibilidad del ensayo. Para evaluar este supuesto experimentalmente, se preparó una réplica de la placa principal I por inoculación de medio LB con las reservas bacterianas congeladas mediante la incubación de la placa a 37°C en un agitador bacteriano. La producción de proteínas se indujo mediante la adición de IPTG cuando los primeros pocillos analizados aleatoriamente alcanzaron una DO600 de aproximadamente 0,8. Cuatro horas más tarde, se añadieron directamente 20 μ l de cada pocillo a 1×10^5 LCL en 200 μ l de medio de LCL. El día siguiente, se extrajeron 100 μ l de sobrenadante y se añadieron 1×10^5 células T específicas de EBNA3A en 100 μ l de medio de LCL. Después de incubación durante la noche, se determinó la secreción de IFN γ por las células T mediante ELISA. Aunque las cantidades de IFN γ por las células T eran inferiores cuando se utilizaron bacterias completas en lugar de proteínas purificadas, los resultados de ambos experimentos eran superponibles, demostrando que las bacterias completas se pueden utilizar para identificar colonias individuales que expresan el epítipo (datos no mostrados).

Localización de epítipos en proteínas difíciles de expresar en bacterias.

[0075] Un potencial impedimento de este procedimiento de identificación de epítipos fue la expresión baja de ciertas proteínas en bacterias. Por ejemplo, las proteínas de membrana tienden a formar agregados, que pueden dar lugar a una expresión de proteínas baja o indetectable. Para evaluar si este método también se podría aplicar a dichos antígenos, se intentó localizar el epítipo reconocido por un clon de células T CD4+ específicas de gp350. La gp350 es una glicoproteína de EBV y un constituyente principal de la envoltura viral. Durante la replicación lítica de EBV, se traduce la gp350 en el ER, se procesa través del aparato de Golgi y se dirige a la membrana plasmática para la envoltura de partículas de virus recién ensambladas (Kieff y Rickinson, 2001). Tal como se esperaba, la expresión de la proteína gp350 en bacterias fue indetectable incluso cuando la proteína etiquetada con His se purificó a partir de cultivos bacterianos a gran escala sobre columnas de Níquel-NTA (datos no mostrados). Para evaluar si el epítipo reconocido por el clon B8 de células T CD4+ específicas de gp350 se podía identificar con la estrategia DEPI (identificación directa de epítipos), la secuencia codificante de gp350 se digirió con enzimas de restricción con corte frecuente y se clonó en la mezcla de vectores de expresión tal como se ha descrito anteriormente. Se detectó una fuerte señal de activación con la preparación de proteínas del grupo IA (figura 11A). Se inocularon los cultivos de suspensión bacteriana de las 48 colonias de este grupo y se indujo la expresión de proteínas mediante la adición de IPTG. Cuatro horas más tarde, se transfirieron 20 μ l de cada cultivo bacteriano directamente en pocillos separados de una placa de 96 pocillos sembradas con 5×10^5 PBMC/pocillo en 200 μ l de medio de LCL, y se añadieron células T el día siguiente. Midiendo la secreción de citoquinas de las células T, se identificó una colonia individual que transportaba un fragmento de 152 pb de gp350 (figura 11B). Utilizando adaptadores sintéticos que abarcan esta secuencia, el epítipo reconocido por el clon B8 de células T CD4+ se definió como AA65-79 FGQLTPHTKAVYQPR. Estos resultados demostraron que los epítipos de MHCII se pueden identificar con el ensayo DEPI incluso en antígenos difíciles de expresar en bacterias.

[0076] El ensayo DEPI descrito aquí ofrece un procedimiento simple y rápido de localizar epítipos en antígenos conocidos. El método se basa en la expresión aleatoria de fragmentos de antígeno fusionados a GFP en bacterias. Debido a su apariencia verde, se identifican fácilmente bacterias recombinantes que expresan las proteínas de fusión antígeno-GFP, reduciendo significativamente el número de colonias a cribar. Además, el nivel elevado de expresión de proteína permite cribar grandes cantidades de bacterias recombinantes, a partir de las cuales se identifican colonias individuales que expresan el epítipo mediante el suministro de las bacterias completas directamente a las APC.

[0077] En el ensayo DEPI, se utilizan enzimas de restricción de corte frecuente para separar el marco de lectura abierto que codifica el antígeno en fragmentos pequeños de ADN. Idealmente, estos fragmentos deben codificar péptidos de 10-20 aminoácidos, la longitud habitual de los péptidos unidos a MHC de clase II. Pueden estrecharse los fragmentos de ADN más grandes, pero no definen el epítipo, mientras que fragmentos más cortos pueden codificar únicamente epítipos parciales. Dado que los sitios de restricción raramente están distribuidos forma uniforme sobre la secuencia codificante del antígeno, se utilizan varias enzimas de restricción diferentes, solas o combinadas, para generar fragmentos uniformemente cortos. Tal como se muestra para EBNA3A, cortar el ADN con diferentes enzimas de restricción también ofrece la ventaja de que se crean fragmentos de ADN parcialmente

solapantes que pueden ayudar a definir el epítipo de forma más precisa. Además, el riesgo potencial de destrucción de epítipos se reduce ampliamente cuando se utilizan varias enzimas con diferentes secuencias de reconocimiento.

5 **[0078]** La digestión con enzimas de restricción genera fragmentos de ADN de extremos romos de longitudes
 10 variantes y en diferentes marcos de lectura. Para asegurar la expresión de todos los fragmentos, se diseñó un
 sistema de vectores que acomoda las inserciones de ADN en todos los marcos de lectura posibles. Como
 consecuencia, los fragmentos de ADN se pueden expresar como proteínas de fusión de GFP etiquetada con His,
 pero sólo en 1/6 de casos en el marco de lectura del antígeno. De este modo, 5/6 de colonias verdes deben
 15 expresar proteínas irrelevantes, aumentando en cinco veces el número de colonias a cribar. Sin embargo, la
 combinación de cuatro nucleótidos da lugar a 64 codones diferentes, de los cuales tres son codones de parada. De
 este modo, a excepción de los marcos de lectura abiertos, la traducción de una secuencia de ADN elegida al azar
 terminará estadísticamente después de 64 pb. En el caso de EBNA3A, el tamaño de inserción promedio de los
 fragmentos antigénicos fue de 83 pb. De este modo, la traducción de la mayoría de fragmentos de ADN en marcos
 20 de lectura irrelevantes debe terminar en el fragmento de ADN y no deben dar lugar a proteínas de fusión verdes. De
 hecho, en las 20 inserciones de las colonias verdes secuenciadas, todos los fragmentos de antígeno se expresaron
 en el mismo marco de lectura que EBNA3A. De este modo, el número de colonias a cribar no debe aumentar debido
 a la expresión de marcos de lectura alternativos cortos, sino que debe depender únicamente de la longitud del ORF
 y el tamaño promedio del fragmento. En el caso de EBNA3A con un ORF de casi 3 kb y un tamaño promedio de
 25 fragmento de 83 pb, aproximadamente cada treinta y cinco colonias verdes se debe expresar el epítipo, siempre
 que las enzimas de restricción dejen la secuencia codificante del epítipo intacta. Se halló la expresión del epítipo
 en 6/10 grupos, consistiendo cada grupo en 48 colonias verdes. Asumiendo que cada grupo positivo contenía sólo
 un clon positivo, esto daría lugar a 1/80 colonias verdes que expresan el epítipo. Este número es más elevado que
 el calculado, ya sea porque algunos grupos contenían más de un clon positivo, el epítipo se destruyó mediante la
 30 digestión con la enzima de restricción CviJI*, o porque algunos fragmentos cortos se tradujeron en marcos de lectura
 abiertos alternativos. Sin embargo, el número era mucho menor que el esperado si los fragmentos insertados se
 expresaban en todos los marcos de lectura posibles. Se obtuvieron resultados similares cuando se identificaron siete
 epítipos adicionales con el ensayo DEPI (Mautner et al., aportado), demostrando adicionalmente la eficacia elevada
 de esta estrategia. Además, se han identificado epítipos de células T limitados por MHC de clase I en proteínas
 expresadas a partir de marcos de lectura abiertos alternativos de genes (Aarnoudse et al., 1999). Si dichos
 35 productos génicos alternativos también dan lugar a epítipos limitados por MHC de clase II, se pueden identificar
 también mediante esta estrategia de expresión aleatoria.

[0079] Se ha descrito previamente que las células dendríticas de ratón son capaces de ingerir las bacterias
 35 completas y presentar péptidos derivados de proteínas bacterianas en MCH de clase (Sahara y Shastri, 2003). Estos
 resultados motivaron el análisis de si la etapa de purificación de las proteínas se podía omitir mediante la incubación
 de LCL o PBMC directamente con bacterias recombinantes vivas. Ambos tipos de APC fueron capaces de presentar
 antígenos expresados bacteriamente de manera eficaz en MHC de clase II. Además, el reconocimiento tuvo sobre
 un amplio intervalo de concentraciones, de manera que es improbable que las fluctuaciones en la velocidad de
 40 crecimiento de colonias individuales en placas de 96 pocillos disminuyan con la sensibilidad del ensayo. Sin
 embargo, probablemente en respuesta al reconocimiento inmune innato de componentes microbianos, las PBMC a
 menudo secretaban cantidades sustanciales de citoquinas tras la incubación con bacterias, incluyendo IFN γ y GM-
 CSF. Este nivel base de citoquinas se anula fácilmente mediante la irradiación (40 Gy) y lavado de las células
 después de la incubación con bacterias. Se eligieron los dos tipos de APC, PBMC y LCL, porque se ha observado
 45 que ambos presentan antígenos exógenos de manera eficaz en el MHC de clase (Mautner et al., 2004) y, a
 diferencia de las células dendríticas, ambos se pueden obtener de muestras pequeñas de sangre. De este modo,
 incluso en casos en los que el material clínico está limitado, el ensayo DEPI se puede realizar con APC del mismo
 donante, del que se han establecido las células T. Esto permite la localización del epítipo sin conocimiento del
 elemento de restricción de las células T.

50 **[0080]** De este modo, el ensayo DEPI ofrece un método simple y rápido para la identificación de epítipos de MHC II,
 incluso en proteínas difíciles de expresar en bacterias. La inserción de adaptadores sintéticos en lugar de
 fragmentos génicos en el vector de expresión permite localizar epítipos de manera precisa y valorar el papel de los
 aminoácidos individuales en el reconocimiento de células T o la unión a MHC. Además, la elevada sensibilidad y
 55 simplicidad del ensayo DEPI justifica los experimentos adicionales para adaptar este método a aplicaciones
 adicionales, por ejemplo, la definición de epítipos reconocidos por anticuerpos, o la identificación de antígenos
 desconocidos.

Materiales y métodos

Cepas y cultivo bacteriano

- 5 Véase el Ejemplo 1
Construcción del vector de expresión

[0081] Todas las manipulaciones de ADN se realizaron según los procedimientos estándar (Sambrook et al., 2001). Para generar un vector de expresión que permitía la inserción de fragmentos antigénicos entre la etiqueta de His en el extremo amino y la GFP en el extremo carboxilo, el marco de lectura abierto de GFP se clonó por primera vez en los sitios KpnI-HindIII del vector de expresión bacteriana pTrcHisA (Invitrogen) para producir el plásmido GFP-pTrcHisA. En este plásmido, se introdujo un sitio de clonación múltiple inmediatamente en dirección 5' del ORF de GFP mediante la inserción de un adaptador de ADN en los sitios de restricción únicos Agel y XhoI, dando lugar al plásmido F250A (oligo F250 de sentido: TCGAGGCCTAATTAGCTGATGGCCAGCGCTACGTA; oligo F250 de antisentido: CCGGTACGTAGCGCTGGCCATCAGCTAATTAGGCC). Este plásmido se digirió con Agel y parcialmente con NcoI y un adaptador de ADN que codifica un adaptador de péptido de glicina-serina (G)₄S(G)₄S(G)₄ insertado (oligo F288 de sentido: CCGGTGGCGGCGGGAGCGGGGGCGGGGGCAGCGGGGGCGGGGG; oligo F288 de antisentido: CATCCCCCGCCCCGCTGCCCGCCCCCGCTCCCGCCGCCA). Este plásmido designado como F288A se cortó con XhoI y parcialmente con BamHI. Se insertaron dos adaptadores diferentes en este plásmido, provocando un desplazamiento en el marco de lectura en las posiciones +1 o +2 (figura 1). Estas dos versiones adicionales del vector se designaron como F288B y F288C.

[0082] Los adaptadores se prepararon mezclando cantidades equimolares (100 pmol/μl) de oligonucleótidos de sentido y antisentido. Para formar adaptadores de doble cadena, la mezcla se calentó hasta 95°C durante 5 min, y a continuación, se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente. A continuación, se unió 1 μl de adaptador hibridado con 300 ng de vector digerido con las enzimas de restricción indicadas. La integridad de todos los plásmidos se verificó mediante la digestión con enzimas de restricción y el análisis de secuencia de las regiones modificadas.

[0083] Para la inserción de fragmentos de ADN antigénicos en el vector expresión, se mezclaron cantidades iguales de los plásmidos F288A, B, y C y se cortaron con StuI. Después de la extracción con fenol/cloroformo, los plásmidos linealizados se dividieron en tres muestras que a continuación se digirieron con MscI, Eco47III, o SnaBI, y se trataron con CIP para evitar que se vuelva a unir el vector. Después del tratamiento con fenol/cloroformo, el ADN vector se separó en un gel de agarosa y se purificó utilizando el kit de extracción en gel Qiaex II (Qiagen).

Generación de la biblioteca de expresión

[0084] Los marcos de lectura abiertos que codifican EBNA3A y gp350 se digirieron con cortadores frecuentes seleccionados y si era necesario se trataron con T4 polimerasa para formar extremos romos. Las enzimas de restricción de corte frecuente utilizadas en este estudio Acil, BsaJI, CviJI*, HaeIII, y MnlI (todas de Biolabs, a excepción de CviJI* de EurX). Se unieron 100 ng de este ADN digerido durante la noche a 16°C en 300 ng de vector de expresión en un volumen total de 10 μl. El día siguiente, se utilizó 1 μl de la mezcla de unión para transformar XL1-Blue MRF, y las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB agar que contenían antibióticos e IPTG 1 mM. Se recogieron colonias verdes con puntas estériles y se transfirieron a pocillos individuales de placas de 96 pocillos rellenos con 200 μl de medio de supercaldo suplementado con antibióticos y se incubaron durante la noche a 37°C. El número mínimo de colonias verdes a cribar se calculó dependiendo del número de sitios de restricción en el marco de lectura abierto del antígeno. Por ejemplo, el ORF de EBNA3A es de 2835 pb. La digestión completa de la secuencia codificante con la enzima de restricción HaeIII genera 35 fragmentos. Dado que los fragmentos de ADN se pueden insertar en cualquier orientación, se puede expresar un fragmento determinado como proteínas de fusión de GFP etiquetada con His en seis marcos de lectura diferentes. De este modo, el número mínimo de colonias a recoger es 35 x 6. Dado que la inserción de un fragmento en un marco de lectura irrelevante puede provocar la terminación de la traducción, el número real resultó ser muy inferior (ver la Discusión). A partir de cada placa de 96 pocillos, se realizaron dos grupos de 48 colonias mediante la transferencia de 100 μl de cultivo bacteriano de cada pocillo a 400 ml de medio de Supercaldo. Al resto del cultivo bacteriano en las placas de microtitulación, se añadieron 100 μl de medio LEB que contenía glicerol al 40%, y las placas se congelaron como placas madre a -80°C. Los grupos bacterianos se incubaron bajo agitación vigorosa a 37°C en un agitador bacteriano y se indujo la expresión de proteínas mediante la adición de IPTG cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica DO600 de 0,8. Cuatro horas más tarde, las bacterias se centrifugaron (3000xg/15min) y el residuo celular se resuspendió en 50 ml de tampón de lisis (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM, urea 8M, imidazol 10 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 8,0). Después de la centrifugación (5000xg/15min) para agrupar los residuos bacterianos insolubles, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 300 μl de agarosa Níquel-NTA (Qiagen).

Las proteínas etiquetadas con His se dejaron unir a la agarosa recubierta de níquel mediante incubación durante la noche a 4°C bajo agitación constante. El día siguiente, las perlas de agarosa Níquel-NTA se agruparon mediante centrifugación (2000xg/10min), y se lavaron una vez con tampón de lisis. Para eluir las proteínas, las perlas se incubaron tres veces con 300 µl de tampón de elución (tampón de lisis con imidazol 500 mM, pH 7,5) y el sobrenadante que contenía proteína se recogió después de cada etapa de incubación mediante centrifugación (10.000xg/3 min). El eluato recogido se dializó contra PBS durante dos días. Se añadieron 10 µl de esta solución de proteínas, que contenía habitualmente 500 µg/ml de proteína, a APC en 200 µl en un pocillo de una placa de microtitulación.

[0085] Cuando se suministraron las bacterias completas a APC, se utilizaron cultivos bacterianos en placas de 96 pocillos para inocular placas de pocillos profundos (Peglab) que contenían 1,5 ml/pocillo de medio de supercaldo y antibióticos. La expresión de proteínas se indujo mediante la adición de IPTG cuando la densidad óptica en pocillos elegidos al azar alcanzó una DO600 de 0,8. Cuatro horas más tarde, de cada pocillo se transfirieron 20 µl de cultivo bacteriano en pocillos individuales de placas de microtitulación de base plana sembradas con 1×10^5 LCL ó 5×10^5 PBMC/pocillo en 200 µl de medio de LCL. Las APC se incubaron con las bacterias durante 24 horas. Cuando se utilizaron PBMC, las células se irradiaron (40 Gy) y se lavaron antes de la adición de células T. Posteriormente, se extrajeron 100 µl de sobrenadante por pocillo y se añadieron 1×10^5 células T en 100 µl de medio de LCL.

Aislamiento y cultivo de clones de células T

[0086] La generación de líneas de células T específicas y el aislamiento y expansión de clones de células T CD4+ se han descrito previamente (Mautner et al., 2004). En este estudio se utilizaron los siguientes clones de células T auxiliares: 3A-3D5 que reconoce AA₁₄₂₋₁₅₆-RQAIRD_{RRRNPASRR} de EBNA3A; gp-B8 que reconoce AA₆₅₋₇₉-FGQLTPHTKAVYQPR de gp350 y MI-E5 que reconoce AA₂₃₄₋₂₄₈-LENLQAYQKRMGVQL de M1 de gripe. Todos los clones de células T están limitados a HLA-DRBI*1301. Los primeros dos epítomos se identificaron en este trabajo. Los ensayos de secreción de citoquinas se realizaron tal como se ha descrito (Mautner et al., 2004). Brevemente, se sembraron 1×10^5 LCL ó 5×10^5 PBMC por pocillo de una placa de base plana de 96 pocillos en 200 µl de medio de LCL (RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales al 1%, piruvato sódico 1 mM, gentamicina 50 µg/ml y FCS al 10%). Las células se incubaron durante 24 horas con proteínas purificadas o bacterias completas. Al final del periodo de incubación, se extrajeron 100 µl de sobrenadante y se añadieron 1×10^5 células T en 100 µl de medio de LCL. La secreción de citoquinas por las células T se midió 20 horas más tarde mediante ELISA (R&D Systems).

Análisis de colonias bacterianas planas

[0087] Las colonias bacterianas positivas individuales se desarrollaron durante la noche y se aisló el ADN plasmídico según las directrices del fabricante (Qiagen). El ADN plasmídico se secuenció utilizando el cebador directo de pTrcHis (GAGGTATATATTAATGTATCG).

Identificación de un antígeno tumoral de células T auxiliares mediante el cribado de una biblioteca de expresión de ADNc derivado de tumor utilizando el método DANI

[0088] Para generar una biblioteca de expresión de ADNc derivado de tumor, se aisló ARNm de las células tumorales y se transcribió en ADNc de doble cadena. Después de la digestión con enzimas de restricción de corte frecuente, los fragmentos de ADNc de 300-3000 pb de longitud se unieron en el sistema de vectores de expresión bacteriana descrita en el método DANI. Se transformaron bacterias XL-1 de E. coli con la mezcla de unión y se llevaron a placas de 96 pocillos grupos de 60 unidades formadores de colonias (cfu) bacterianas/pocillo. La producción de proteína recombinantes se indujo mediante la adición de IPTG cuando las suspensiones bacterianas alcanzaron una densidad óptica DO600 de 1. Cuatro horas más tarde, se añadieron alícuotas de los cultivos bacterianos a células presentadoras de antígenos (APC) que después de la fagocitosis de las bacterias, presentan péptidos derivados de proteínas bacterianas – incluyendo proteínas tumorales recombinantes – en moléculas de MHC de clase II. Después de 24 horas de incubación, las APC pulsadas con bacterias se cocultivaron con el clon C1-9 de células T específicas de tumor derivado del paciente con tumor durante 24 horas de nuevo. Posteriormente, se midió mediante ELISA el contenido de GM-CSF en el sobrenadante de cultivo celular.

[0089] Se cribaron un tota de quince placas de 96 pocillos (equivalente a $15 \times 96 \times 60 = 86400$ colonias bacterianas individuales o fragmentos de ADNc).

[0090] Tal como se ejemplifica en la figura 12, no se detectó ninguna señal específica por encima de la señal base en 14 de las 15 placas. En este ejemplo, el clon de células T no reconoció ninguna de las proteínas expresadas en los grupos bacterianos de la placa #2. Dado que las células T secretan citoquinas sólo en respuesta al reconocimiento de antígenos, no se detectó señal específica por encima de la señal base.

[0091] De las quince placas con 96 pocillos cribadas, sólo el grupo bacteriano en el pocillo E3 de la placa tres estimuló el clon de células t.

5 **[0092]** Figura 13: el pocillo E3 de la placa #3 indujo la secreción de GM-CSF por las células T. El grupo bacteriano del pocillo E3 se emplacó en placas de agar y se analizó el reconocimiento por células T de las colonias bacterianas individuales. De las 96 colonias individuales analizadas, seis fueron reconocidas por las células T. Estas seis colonias se expandieron, los plásmidos se extrajeron y las inserciones de ADN se secuenciaron.

10 **[0093]** Figura 14: De las 96 colonias bacterianas individuales, seis fueron reconocidas por el clon C1-9 de células T. Todos los plásmidos extraídos de las seis colonias bacterianas contenían la misma inserción de ADNc derivada de un gen celular expresado en el tumor. El epítipo reconocido por la célula T se localizó utilizando el método DEPI y posteriormente se verificó utilizando péptidos sintéticos. Estos resultados demuestran que se pueden identificar antígenos reconocidos por células T auxiliares en bibliotecas de ADNc complejas utilizando el método DANI.

15 Referencias

[0094]

- 20 Alderson, M.R., Bement, T., Day, C.H., Zhu, L., Molesh, D., Skeiky, Y.A., Coler, R., Lewinsohn, D.M., Reed, S.G. and Dillon, D.C. (2000) Expression cloning of an immunodominant family of Mycobacterium tuberculosis antigens using human CD4(+) T cells. *J Exp Med*, 191, 551-560.
- Behrends U, Jandl T, Golbeck A, Lechner B, Muller-Wehrich S, Schmid I, Till H, Berthold F, Voltz R, Mautner JM. (2002) Novel products of the HUD, HUC, NNP-1 and alpha-internexin genes identified by autologous antibody screening of a pediatric neuroblastoma library. *Int J Cancer*, 100, 669-677.
- 25 Davis, I.D., Chen, W., Jackson, H., Parente, P., Shackleton, M., Hopkins, W., Chen, Q., Dimopoulos, N., Luke, T., Murphy, R., Scott, A.M., Maraskovsky, E., McArthur, G., MacGregor, D., Sturrock, S., Tai, T.Y., Green, S., Cuthbertson, A., Maher, D., Miloradovic, L., Mitchell, S.V., Ritter, G., Jungbluth, A.A., Chen, Y.T., Gnjatic, S., Hoffman, E.W., Old, L.J. and Cebon, J.S. (2004) Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 10697-10702.
- 30 De Plaen E, Lurquin C, Lethe B, van der Bruggen P, Brichard V, Renauld JC, Coulie P, Van Pel A, Boon T. (1997) Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Methods*. 12, 125-142.
- Fujii, S., Senju, S., Chen, Y.Z., Ando, M., Matsushita, S. and Nishimura, Y. (1998) The CLIP-substituted invariable chain efficiently targets an antigenic peptide to HLA class II pathway in L cells. *Hum Immunol*, 59, 607-614.
- 35 Gorgievski-Hrisoho, M., Hinderer, W., Nebel-Schickel, H., Horn, J., Vornhagen, R., Sonnebom, H.H., Wolf, H. and Siegl, G. (1990) Serodiagnosis of infectious mononucleosis by using recombinant Epstein-Barr virus antigens and enzyme-linked immunosorbent assay technology. *J Clin Microbiol*, 28, 2305-2311.
- (Halder T, Pawelec G, Kirkin AF, Zeuthen J, Meyer HE, Kun L, Kalbacher H. (1997) Isolation of novel HLA-DR restricted potential tumor-associated antigens from the melanoma cell line FM3. *Cancer Res*, 57, 3238-3244.
- 40 Hamanaka Y, Suehiro Y, Fukui M, Shikichi K, Imai K, Hinoda Y. (2003) Circulating anti-MUC1 IgG antibodies as a favorable prognostic factor for pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 103, 97-100.
- Horst, E., Wijngaard, P.L., Metzelaar, M., Bast, E.J. and Clevers, H.C. (1991) Un método for cDNA cloning in COS cells irrespective of subcellular site of expression. *Nucleic Acids Res*, 19, 4556.
- 45 Jager, E., Nagata, Y., Gnjatic, S., Wada, H., Stockert, E., Karbach, J., Dunbar, P.R., Lee, S.Y., Jungbluth, A., Jager, D., Arand, M., Ritter, G., Cerundolo, V., Dupont, B., Chen, Y.T., Old, L.J. and Knuth, A. (2000) Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4760-4765.
- Kalams, S.A. and Walker, B.D. (1998) The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*, 188, 2199-2204.
- 50 Kieff, E. and Rickinson, A.B. (2001) Epstein-Barr virus and its replication. In: B.N. Fields, D.M. Knipe and P.M. Howley (Eds.) *Fields Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 2511-2573. Kortt, A.A., Dolezal, O., Power, B.E. and Hudson, P.J. (2001) Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scfvs for cancer targeting. *Biomol. Eng*, 18, 95-108.
- Lemmel, C. and Stevanovic, S. (2003) The use of HPLC-MS in T-cell epitope identification. *Methods*, 29, 248-259.
- 55 Mautner J, Pich D, Nimmerjahn F, Milosevic S, Adhikary D, Christoph H, Witter K, Bornkamm GW, Hammerschmidt W, Behrends U. (2004) Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 evades direct immune recognition by CD4+ T helper cells. *Eur J Immunol*, 34, 2500-2509.
- McShane, M.P. and Longnecker, R. (2004) Cell-surface expression of a mutated Epstein-Barr virus glycoprotein B allows fusion independent of other viral proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 17474-17479.
- 60 Monach, P.A., Meredith, S.C., Siegel, C.T. and Schreiber, H. (1995) A unique tumor antigen produced by a single amino acid substitution. *Immunity*, 2, 45-59.
- Moosmann, A., Khan, N., Cobbold, M., Zentz, C., Delecluse, H.J., Hollweck, G., Hislop, A.D., Blake, N.W., Croom-Carter, D., Wollenberg, B., Moss, P.A., Zeidler, R., Rickinson, A.B. and Hammerschmidt, W. (2002) B cells

- immortalized by a mini-Epstein-Barr virus encoding a foreign antigen efficiently reactivate specific cytotoxic T cells. *Blood*, 100, 1755-1764.
- Neuhierl, B., Feederle, R., Hammerschmidt, W. and Delecluse, H.J. (2002) Glycoprotein gp110 of Epstein-Barr virus determines viral tropism and efficiency of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 15036-15041.
- 5 Nimmerjahn, F., Kobelt, D., Steinkasserer, A., Menke, A., Hobom, G., Behrends, U., Bornkamm, G.W. and Mautner, J. (2003) Efficient generation and expansion of antigen-specific CD4+ T cells by recombinant influenza viruses. *Eur J Immunol*, 33, 3331-3341.
- Pieper, R., Christian, R.E., Gonzales, M.I., Nishimura, M.I., Gupta, G., Settlage, R.E., Shabanowitz, J., Rosenberg, S.A., Hunt, D.F. and Topalian, S.L. (1999) Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells. *J Exp Med*, 189, 757-766.
- 10 Romero, P., Cerottini, J.C. and Speiser, D.E. (2004) Monitoring tumor antigen specific T-cell responses in cancer patients and phase I clinical trials of peptide-based vaccination. *Cancer Immunol Immunother*, 53, 249-255.
- Sahara, H. and Shastri, N. (2003) Second class minors: molecular identification of the autosomal H46 histocompatibility locus as a peptide presented by major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med*, 197, 375-385.
- 15 Sahin, U., Tureci, O. and Pfreundschuh, M. (1997) Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol*, 9, 709-716.
- Sanderson, S., Frauwirth, K. and Shastri, N. (1995) Expression of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain-antigen fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7217-7221.
- 20 Speiser, D.E., Pittet, M.J., Rimoldi, D., Guillaume, P., Luescher, I.F., Lienard, D., Lejeune, F., Cerottini, J.C. and Romero, P. (2003) Evaluation of melanoma vaccines with molecularly defined antigens by ex vivo monitoring of tumor-specific T cells. *Semin Cancer Biol*, 13, 461-472.
- van Bergen, J., Schoenberger, S.P., Verreck, F., Amons, R., Offringa, R. and Koning, F. (1997) Efficient loading of HLA-DR with a T helper epitope by genetic exchange of CLIP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 7499-7502.
- 25 van de Corput, L., Chau, P., van der Meijden, E.D., De Plaen, E., Frederik Falkenburg, J.H. and van der Bruggen, P. (2005) A novel approach to identify antigens recognized by CD4 T cells using complement-opsonized bacteria expressing a cDNA library. *Leukemia*, 19, 279-285.
- Wang, R.F., Wang, X., Atwood, A.C., Topalian, S.L. and Rosenberg, S.A. (1999a) Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. *Science*, 284, 1351-1354.
- 30 Wang, R.F., Wang, X. and Rosenberg, S.A. (1999b) Identification of a novel major histocompatibility complex class II-restricted tumor antigen resulting from a chromosomal rearrangement recognized by CD4(+) T cells. *J Exp Med*, 189, 1659-1668.
- Wong, D.K., Dudley, D.D., Dohrenwend, P.B., Lauer, G.M., Chung, R.T., Thomas, D.L. and Walker, B.D. (2001) Detection of diverse hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of infected persons by screening for responses to all translated proteins of HCV. *J Virol*, 75, 1229-1235.
- 35 Zeng, G., Li, Y., El-Gamil, M., Sidney, J., Sette, A., Wang, R.F., Rosenberg, S.A. and Robbins, P.F. (2002) Generation of NY-ESO-1-specific CD4+ and CD8+ T cells by a single peptide with dual MHC class I and class II specificities: a new strategy for vaccine design. *Cancer Res*, 62, 3630-3635.
- 40

LISTADO DE SECUENCIAS

[0095]

- 5 <110> GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH
 <120> Método de identificación antígenos celulares T CD4+
 <130> P20626
 <150> EP05008924.2
 <151> 2005-04-22
 <160> 15
- 10 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 15 <220>
 <223> epítipo central
 <400> 1
- 20 Asp Asn Glu Ile Phe Leu Thr Lys Lys Met Thr Glu Val Cys Gln
 1 5 10 15
- 25 <210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
- 30 <223> epítipo central
 <400> 2
- 35 Thr Asp Ala Trp Arg Phe Ala Met Asn Tyr Pro Arg Asn Pro Thr
 1 5 10 15
- 40 <210> 3
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
- 45 <223> cebador oligonucleótido
 <400> 3
 gatccgagct cgaggcctaa ttagctgatg gccagcgcta cgtaccg 47
 <210> 4
 <211> 47
 <212> ADN
- 50 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleótido
 <400> 4
 gatccgggtac gttagcgctgg ccatcagcta attaggcctc gagctcg 47
- 55 <210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
- 60 <223> epítipo
 <400> 5

Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Leu
 1 5 10 15

5

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador directo
 <400> 6
 gaggtatata ttaatgtatc g 21

10

15

<210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> epítopo
 <400> 7

25

Phe Gly Gln Leu Thr Pro His Thr Lys Ala Val Tyr Gln Pro Arg
 1 5 10 15

30

<210> 8
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleótido
 <400> 8
 tcgaggccta attagctgat gccagcgct acgta 35

35

40

<210> 9
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleótido
 <400> 9
 ccggtacgta gcgctggcca tcagctaatt aggcc 35

45

50

<210> 10
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleótido
 <400> 10
 ccggtggcgg cgggagcggg gccgggggca gcgggggagg ggg 43

55

60

<210> 11
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleótido

ES 2 370 336 T3

<400> 11
catgcccccg cccccgctgc ccccccccc gctccccgceg cca 43
<210> 12
<211> 15
5 <212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> epítopo
<400> 12

10

Arg Gln Ala Ile Arg Asp Arg Arg Arg Asn Pro Ala Ser Arg Arg
1 5 10 15

15

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
20 <213> artificial
<220>
<223> epítopo
<400> 13

25

30 Phe Gly Gln Leu Thr Pro His Thr Lys Ala Val Tyr Gln Pro Arg

1 5 10 15

35

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
40 <213> artificial
<220>
<223> epítopo
<400> 14

45 Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Leu
1 5 10 15

50

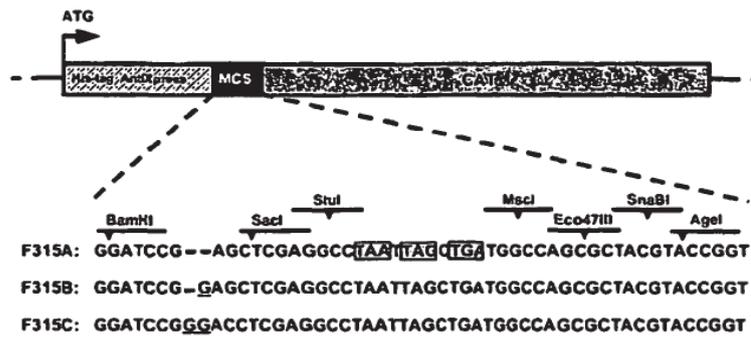
<210> 15
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial
<220>
55 <223> cebador directo
<400> 15
gaggtatata ttaatgtatc g 21

REIVINDICACIONES

1. Método de identificación de antígenos celulares T CD4+ que comprende las etapas de
- 5 a) proporcionar un ácido nucleico que codifica un antígeno de células que expresan antígeno o tejido y obtener fragmentos antigénicos de dicho ácido nucleico, donde los fragmentos tienen un tamaño que varía de 25 a 300 pb, preferiblemente de 40 a 200 pb, y, lo más preferible, aproximadamente 90 pb;
- b) expresar uno o más de dichos fragmentos como una proteína de fusión que comprende dicho fragmento y un marcador en una célula huésped adecuada, donde la célula huésped se selecciona entre células bacterianas;
- 10 c) poner en contacto dicha célula que expresa la proteína de fusión con células presentadoras de antígenos (APC) y cocultivar con células T CD4+ específicas de antígeno;
- d) determinar si las células T CD4+ son activadas por dichas células que expresan la proteína de fusión.
2. Método según la reivindicación 1, en el que los fragmentos se obtienen mediante la separación del ácido nucleico que codifica el antígeno con una o más enzimas de restricción de corte frecuente que se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en Acil, MnlI, BsaJI, CviJI o digerido con nucleasas, por ejemplo, DNaseI.
- 15 3. Método según una o más de las reivindicaciones 1-2, en el que dichos fragmentos se expresan como una proteína de fusión introduciendo un vector de expresión, preferiblemente un plásmido, que contiene la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el fragmento y un marcador, en la célula huésped.
- 20 4. Método según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el gen marcador se selecciona entre genes de resistencia a antibióticos, preferiblemente cloramfenicol acetiltransferasa (CAT), entre genes marcadores fluorescentes, que codifican preferiblemente proteína fluorescente verde o roja, o LacZ.
- 25 5. Método según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el ácido nucleico que codifica el antígeno es ADNc obtenido mediante la transcripción de ARNm aislado de las células que expresan antígeno o tejido en ADNc.
- 30 6. Método según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que las APC se seleccionan entre células dendríticas, macrófagos y linfocitos, preferiblemente de una línea celular linfoblastoide (LCL).
7. Método según una o más de las reivindicaciones anteriores, que comprende además expandir las células huésped reconocidas por las células T CD4+ específicas de antígeno e identificar los fragmentos antigénicos mediante análisis de secuencia.
- 35 8. Método según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que la activación de dichas células T CD4+ se mide determinando la secreción o proliferación de citoquinas.
- 40 9. Método según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el antígeno deriva de bacterias, origen viral, de bibliotecas de ADNc o de tejido de pacientes, por ejemplo, explantes de tumores en el caso de pacientes con tumores o tejidos inflamados en los casos de autoinmunidad o infección.
- 45 10. Método según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que las células T CD4+ específicas de antígeno se aíslan mediante una estimulación in vitro de células estimuladoras autólogas, donde las células T CD4+ se aíslan de sangre periférica, órganos linfoides secundarios (por ejemplo, nódulo linfático) o tejido de pacientes (por ejemplo, explantes de tumores en el caso de pacientes con tumores o tejidos inflamados en los casos de autoinmunidad o infección).
- 50

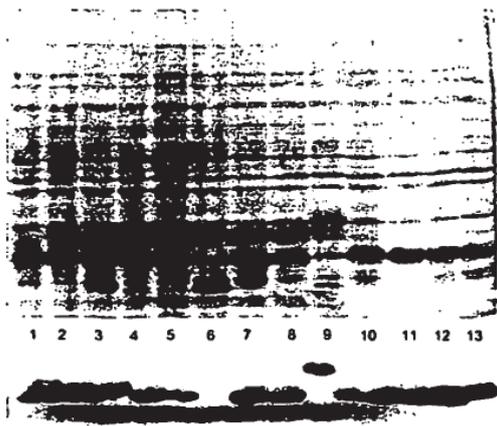
Figura 1

A



B

Tinción con Coomassie®



Transferencia Western

Figura 2

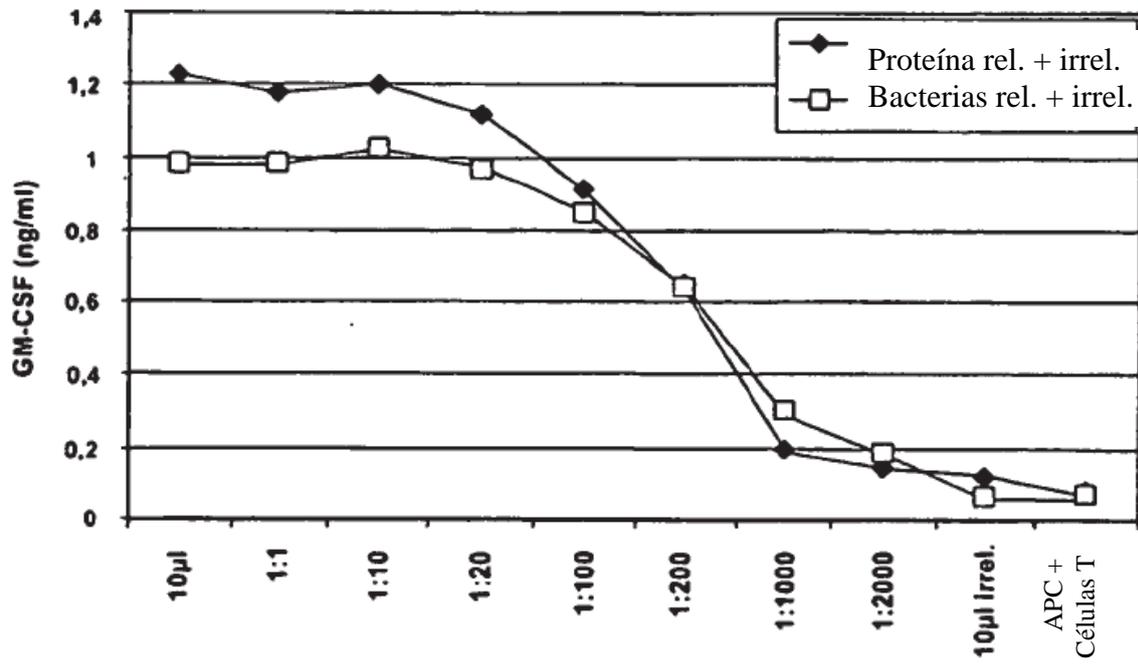
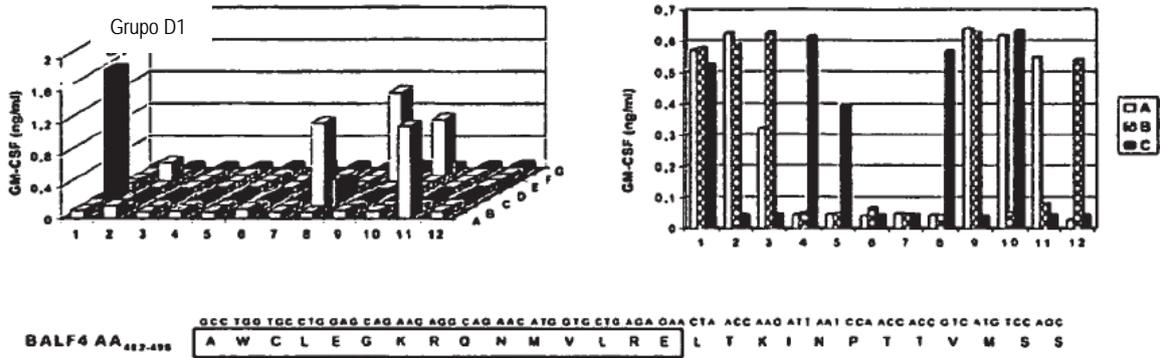


Figura 3



B

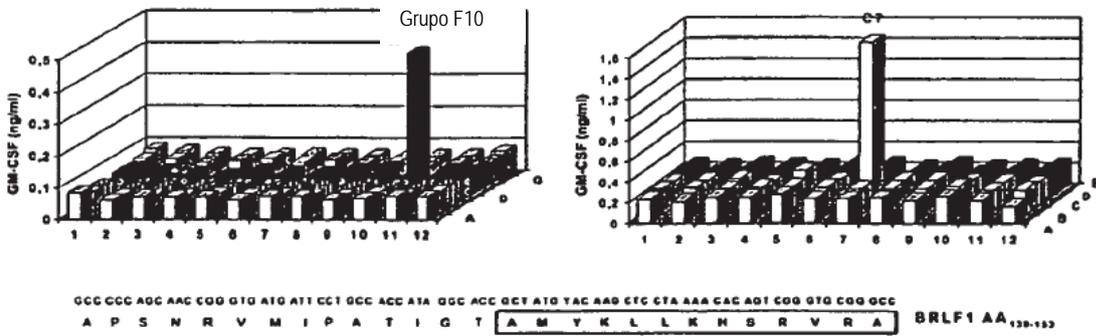


Figura 3C

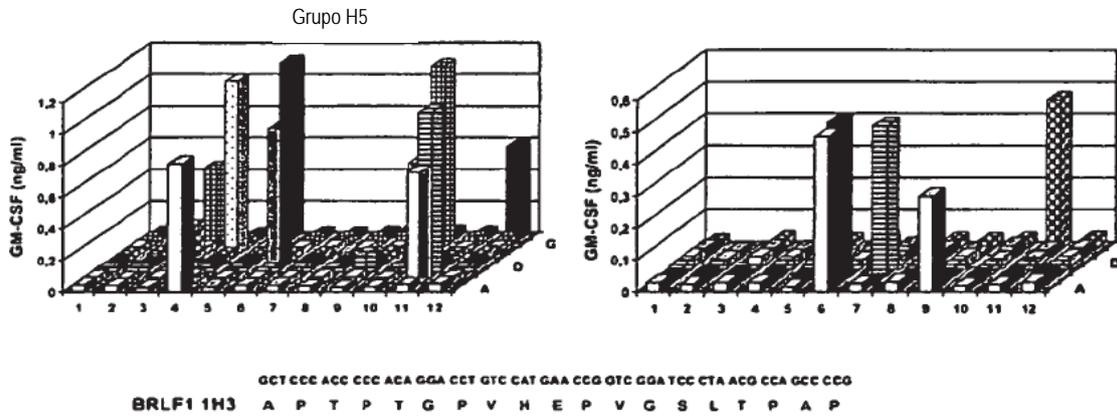
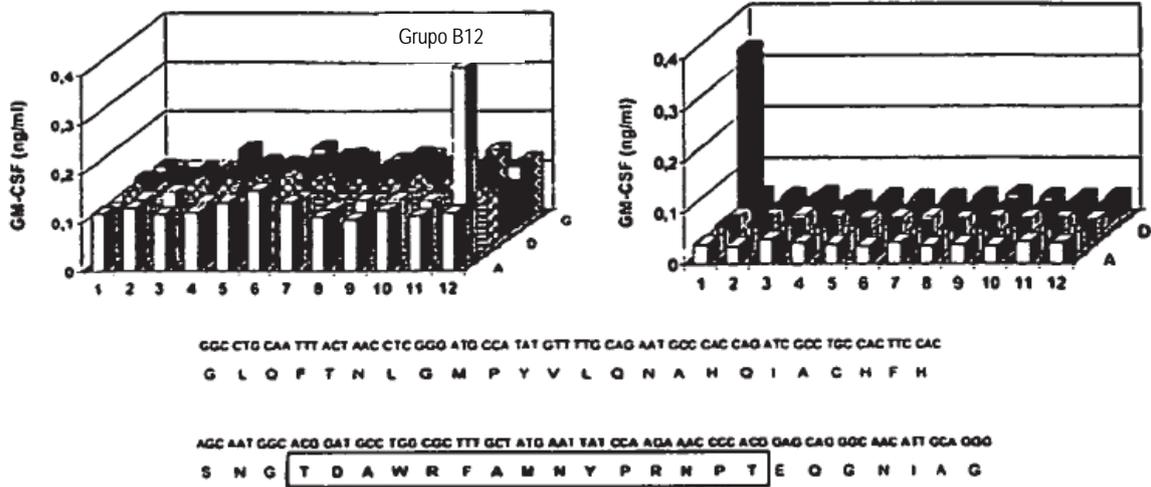


Figura 4

A



B

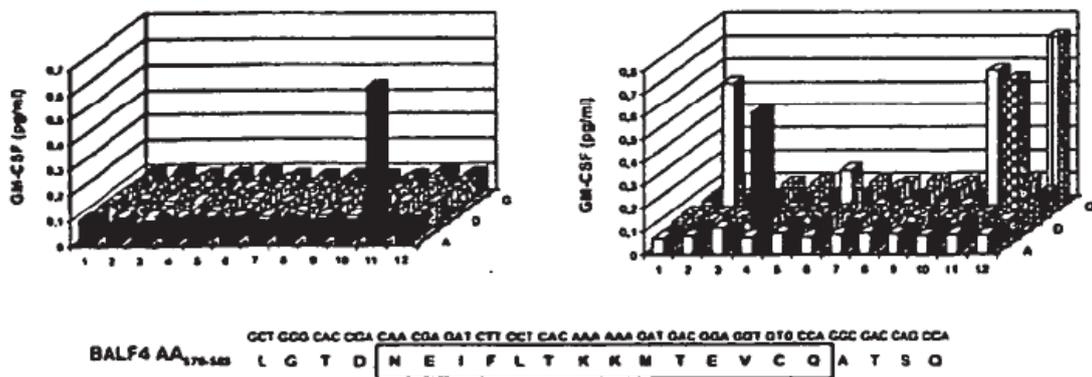


Figura 5

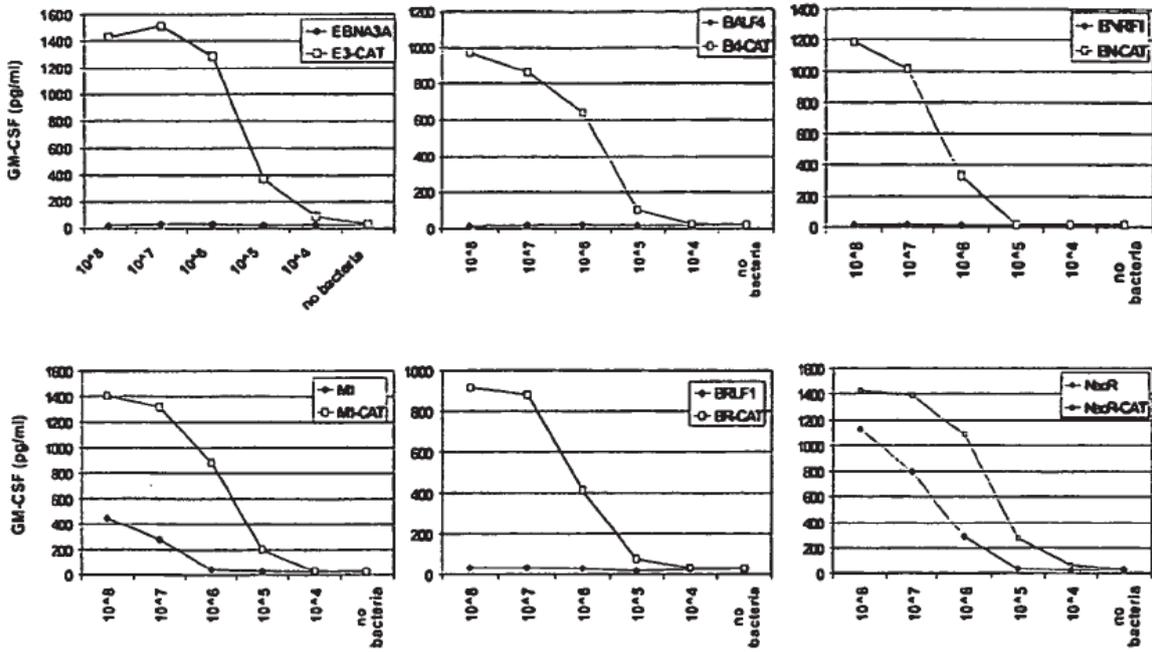


Figura 6

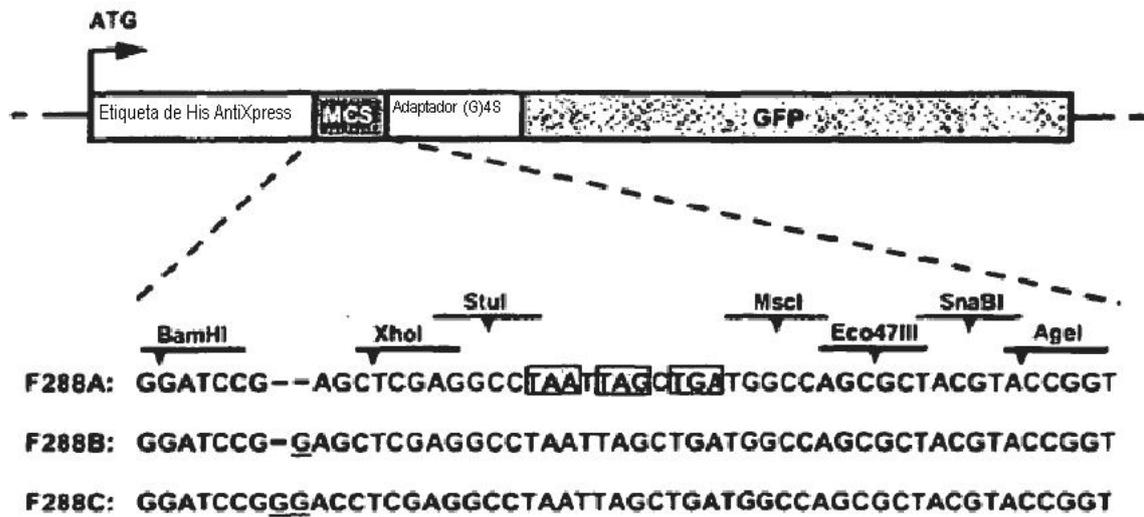


Figura 7



Figura 9

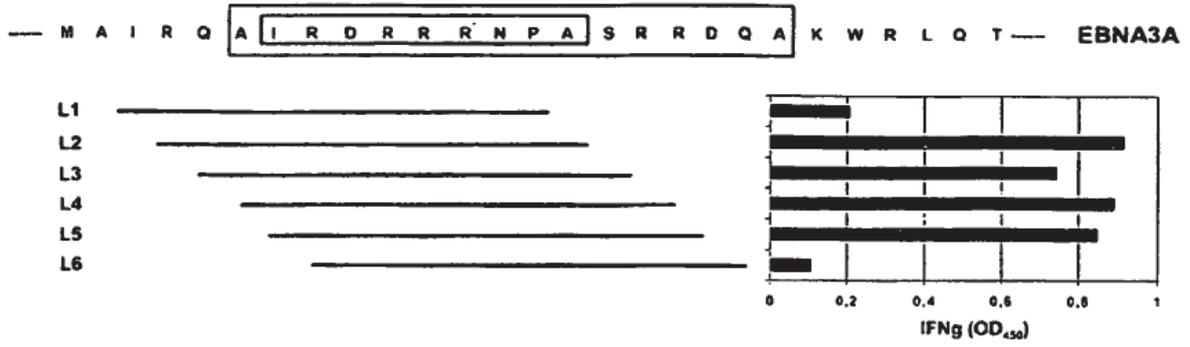


Figura 10

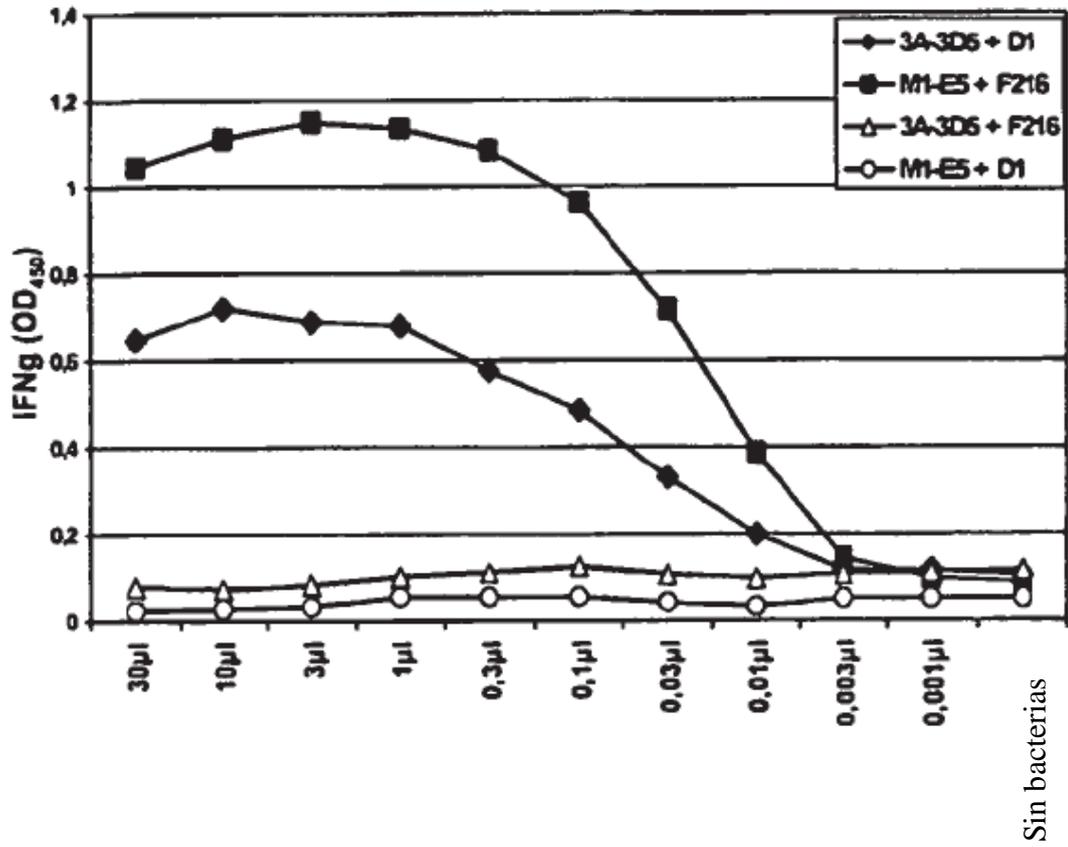
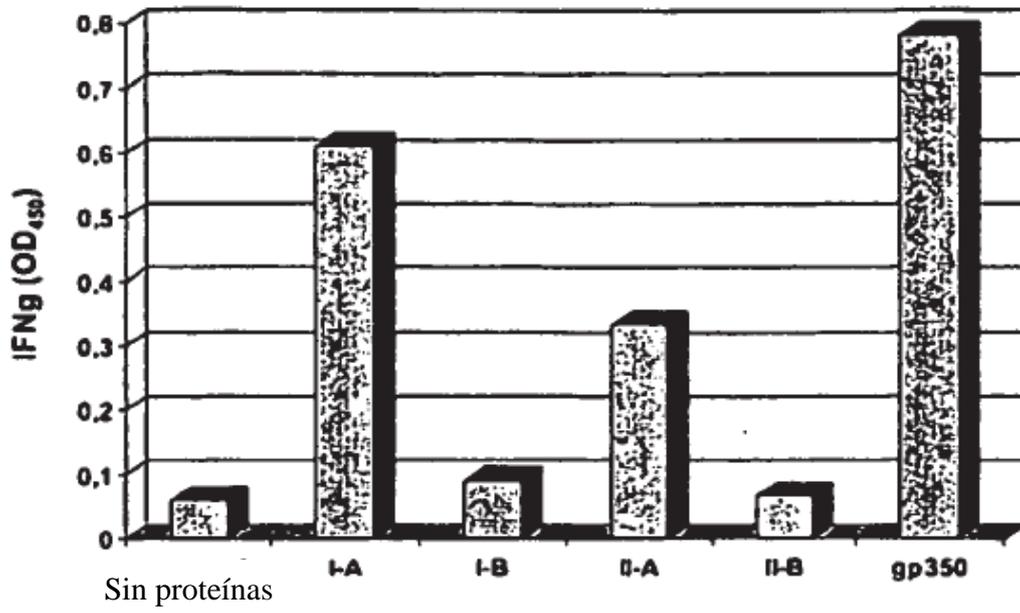


Figura 11



B

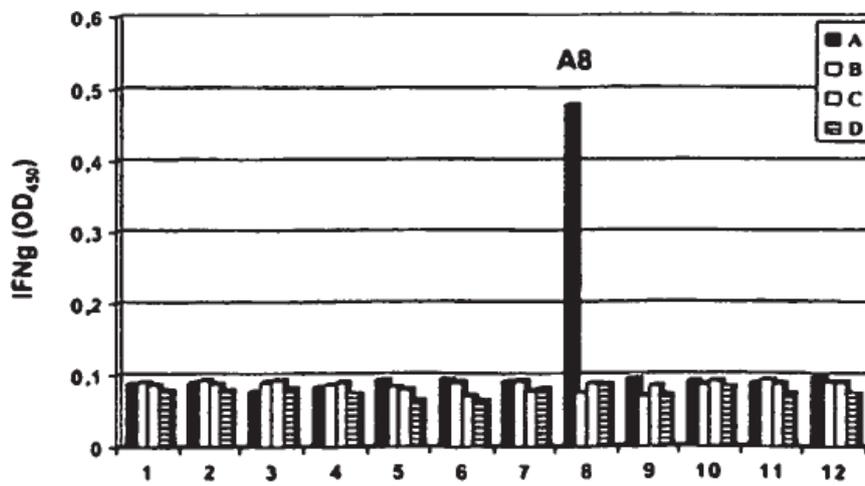


Figura 12

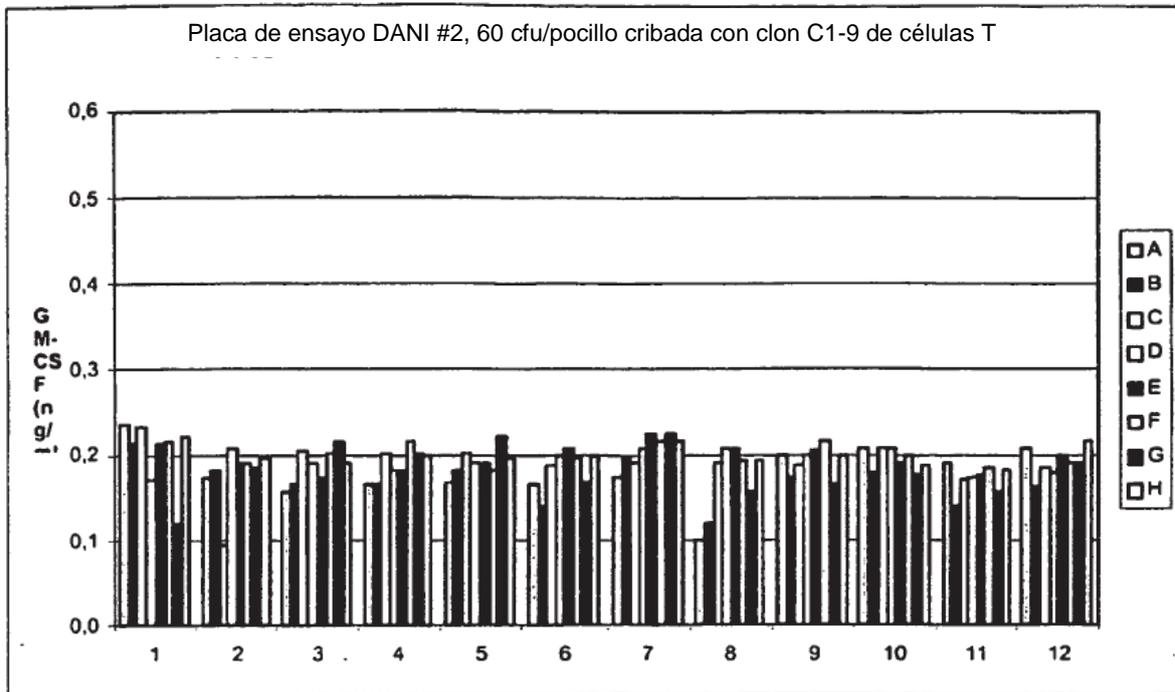


Figura 13

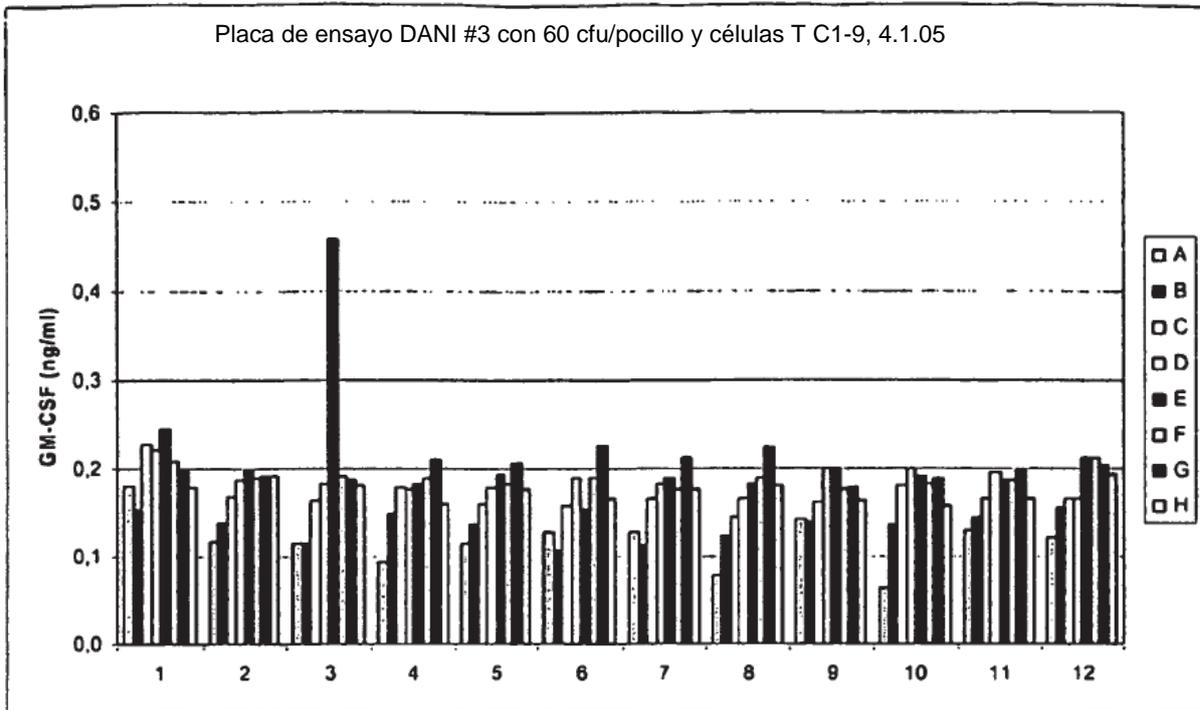


Figura 14

