

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 563**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2006 E 06716584 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 1841791**

54 Título: **Medios y métodos para romper interacciones de unión no covalentes entre moléculas**

30 Prioridad:

25.01.2005 EP 05075196

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la

traducción de la patente:

20.03.2013

73 Titular/es:

**STICHTING HET NEDERLANDS KANKER
INSTITUUT (50.0%)**

PLESMANLAAN 121

1066 CX AMSTERDAM, NL y

STICHTING SANQUIN BLOEDVOORZIENING

(50.0%)

72 Inventor/es:

OVAA, HUIB y

SCHUMACHER, ANTONIUS NICOLAAS MARIA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 398 563 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

Medios y métodos para romper interacciones de unión no covalentes entre moléculas.

La invención se refiere al campo de la unión entre moléculas. La invención, en concreto, se refiere a medios y métodos para romper interacciones no covalentes entre miembros de una molécula proteica multimérica.

- 5 Las interacciones no covalentes son muy importantes, en especial en el campo de la biología. La unión no covalente mantiene unidas las dos hebras de la doble hélice del ADN (enlaces de hidrógeno), pliega a los polipéptidos para producir estructuras secundarias, tales como el alfa-hélice y la conformación beta, permite que las enzimas se unan a su sustrato, permite que los anticuerpos se unan a su antígeno, permite que los factores de transcripción se unan entre sí, permite que los factores de transcripción se unan al ADN, permite que las proteínas (por ejemplo, algunas hormonas) se unan a su receptor, permite el ensamblaje de la maquinaria macromolecular, tal como ribosomas, filamentos de actina, microtúbulos y muchos más.

Existen tres tipos principales de fuerzas no covalentes, a saber, interacciones iónicas, interacciones hidrófobas y enlaces de hidrógeno.

Ejemplos de interacciones iónicas en interacciones de las proteínas

- 15 A cualquier pH concreto, las proteínas tienen grupos cargados que pueden participar en su unión entre sí o a otros tipos de moléculas. Por ejemplo, los grupos carboxilo cargados negativamente en los restos ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu) pueden ser atraídos por los grupos amino protonados cargados positivamente en los restos lisina (Lys) y arginina (Arg).

- 20 Las interacciones iónicas son muy sensibles a los cambios en el pH. A medida que el pH disminuye, se unen H⁺ a los grupos carboxilo (COO⁻) del ácido aspártico (Asp) y del ácido glutámico (Glu), neutralizando su carga negativa, y se unen H⁺ al par de electrones no ocupados del átomo de N de los grupos amino (NH₂) de la lisina (Lys) y la arginina (Arg), otorgándoles una carga positiva. El resultado es que no sólo cambia la carga neta de la molécula (se hace más positiva), sino que se alteran muchas de las posibilidades que tiene su cadena lateral o los grupos de la cadena principal para participar en interacciones iónicas (electrostáticas) con otras moléculas e iones. A medida que aumenta el pH, se retiran H⁺ de los grupos COOH de Asp y Glu, otorgándoles una carga negativa (COO⁻), y se retiran H⁺ de los grupos NH₃⁺ de Lys y Arg, eliminando su carga positiva. El resultado es que cambia la carga neta de la molécula (se hace más negativa) y, de nuevo, se alteran muchas de las posibilidades que tiene su cadena lateral o los grupos de la cadena principal para participar en interacciones electrostáticas con otras moléculas o iones.

- 30 Las interacciones iónicas también son sensibles a la concentración salina. El aumento de la concentración salina reduce la fuerza del enlace iónico proporcionando iones que compiten por los restos cargados.

Ejemplos de interacciones hidrófobas en interacciones de las proteínas

- 35 Las cadenas laterales (grupos R) de aminoácidos tales como fenilalanina y leucina son no polares y, por tanto, interaccionan mal con moléculas polares, tales como el agua. Por esta razón, la mayoría de los restos no polares en proteínas globulares se dirigen hacia el interior de la molécula, mientras que los grupos polares, tales como ácido aspártico y lisina, están sobre la superficie expuesta al disolvente. Cuando los restos no polares están expuestos sobre la superficie de dos moléculas diferentes, es energéticamente más favorable para sus dos superficies no polares "oleosas" que ambas se aproximen mucho, desplazando a las moléculas de agua polares que están entre ambas.

- 40 La fuerza de las interacciones hidrófobas no se ve afectada de forma apreciable por los cambios en el pH o en la concentración salina.

Ejemplos de enlaces de hidrógeno en interacciones de las proteínas

- 45 Los enlaces de hidrógeno puede formarse cuando un átomo fuertemente electronegativo (por ejemplo, oxígeno, nitrógeno) se acerca a un átomo de hidrógeno, que está unido covalentemente a un segundo átomo fuertemente electronegativo.

Algunos ejemplos habituales son: entre el grupo -C=O y los grupos H-N- de distintos enlaces peptídicos en proteínas (que producen el alfa-hélice y la configuración beta); entre grupos -C=O y grupos hidroxilo (H-O-) en los restos serina y treonina y los grupos SH de la cisteína en proteínas y en azúcares.

- 50 Una característica de las interacciones no covalentes es que individualmente son débiles pero colectivamente son fuertes. Las tres formas de interacciones no covalentes son individualmente débiles (del orden de 5 kcal/mol) comparadas con un enlace covalente (con 90-100 kcal/mol de energía de unión). Existen ciertos tipos de enlaces con una energía de enlace intermedia (es decir, entre 15 y 70 kcal/mol). Para la presente invención, estos tipos de enlaces se consideran no covalentes si en sí mismos son insuficientes para asociar a dos moléculas proteicas en un

entorno concreto. En otras palabras, los enlaces no covalentes son aquellos en los que es necesario un número sustancial de interacciones que trabajan juntas para mantener unidas las estructuras. La fuerza limitada que tienen estas interacciones requiere que los grupos que interactúan puedan acercarse mucho (un angstrom o menos).

5 Así, se dice que un multímero que comprende dos o más miembros, en un aspecto, se mantiene unido por enlaces no covalentes si dos o más miembros están unidos por al menos 3 y preferiblemente al menos 5 enlaces que tienen cada uno una energía de enlace menor que 90-100 kcal/mol. Un enlace disulfuro de cisteínas típico que une a dos cadenas proteicas tienen una energía de enlace de aproximadamente 65 kcal/mol. Sin embargo, la fuerza de este enlace depende mucho del entorno reductor/oxidante. Así, para la presente invención, se dice que un multímero se mantiene unido por enlaces no covalentes cuando los enlaces que unen las dos o más cadenas de los miembros
10 tienen cada uno una energía de enlace menor que 65 kcal/mol, y generalmente menor que 20 kcal/mol. Habitualmente, cada uno de dichos enlaces tiene una energía de enlaces de aproximadamente 5 kcal/mol. Así, dos o más miembros en un multímero que se mantienen unidos por enlaces no covalentes presentan un número sustancial de interacciones no covalentes trabajando juntas para mantener unidas las estructuras, y tienen una topografía superficial que permite que áreas sustanciales de dichas al menos dos superficies en interacción se
15 acerquen mucho, es decir, deben encajar entre sí.

La presente invención utiliza la característica de que son necesarios muchos enlaces débiles para mantener unidas las estructuras en una molécula proteica multimérica por medio de una región de interacción no covalente. En la presente invención, al menos un miembro implicado en dicha interacción no covalente en el multímero se escinde en al menos dos miembros nuevos rompiendo al menos un enlace covalente en dicho al menos un miembro del
20 multímero. La ruptura de un enlace covalente produce un multímero que tiene un miembro más que el multímero original. La ruptura de dos enlaces covalentes produce un multímero que tiene dos miembros más, etc. La ruptura de al menos un enlace covalente en el multímero produce una disminución en el número de interacciones no covalentes por miembro del multímero. En la presente invención, esta reducción se utiliza para provocar la disociación de al menos un miembro del multímero. En la presente invención, la ruptura de un enlace covalente se utiliza para reducir
25 el número de enlaces no covalentes por miembro del multímero, de modo que los enlaces no covalentes son insuficientes para mantener la integridad del multímero, o se utiliza la ruptura de un enlace covalente para alterar la conformación del miembro en el que se ha producido esta modificación y con ello provoca la liberación de al menos un miembro del multímero. Después de la liberación de al menos un miembro del multímero, los miembros resultantes pueden ser monómeros, multímeros o sus combinaciones. La ruptura de un enlace covalente en un péptido puede lograrse por medios enzimáticos, medios químicos o medios físicos. La ruptura de un enlace
30 covalente, según se utiliza en la invención, es preferiblemente química o física, es decir, preferiblemente no enzimática. Más preferiblemente, la ruptura de un enlace puede inducirse por medios químicos o por la luz. También se prefiere que se rompa un enlace covalente en el esqueleto peptídico. Un enlace covalente que preferiblemente se rompe es un enlace colocado junto a un enlace peptídico (por tanto, un enlace al otro lado del átomo de nitrógeno).

35 El documento WO 03/016512 se refiere a la biosíntesis natural de MHC, en la que el péptido CLIP de cadena invariable se une a moléculas de MHC de clase II. El péptido CLIP permanece en el surco de unión de MHC hasta que se intercambia por ligandos con mayor afinidad. El documento WO 03/016512 no se refiere a un péptido que comprende un grupo sensible a la luz o sensible al peryodato.

40 El documento WO 2004/007528 se refiere a la biosíntesis de una molécula de MHC modificada, en la que el péptido CLIP está unido a la molécula de MHC a través de un conector peptídico. El péptido CLIP permanece en el surco de unión de MHC hasta el que conector peptídico es escindido de forma proteolítica. El documento WO 03/016512 no se refiere a un péptido que comprende un grupo sensible a la luz o sensible al peryodato.

45 Tal como se emplea en la presente, la expresión "molécula proteica multimérica" se refiere a una molécula proteica que contiene dos o más miembros que están asociados entre sí a través de una región de interacción no covalente. Al menos dos miembros sólo están unidos entre sí a través de interacciones no covalentes, y no a través de interacciones covalentes. Las expresiones "molécula proteica multimérica" y "proteína multimérica" se emplean de modo intercambiable en la descripción. La molécula proteica multimérica de la presente invención generalmente contiene al menos un polipéptido.

50 La expresión "región de interacción no covalente" se refiere a una región en la que dos o más miembros se asocian e interactúan entre sí a través de al menos 3 y preferiblemente al menos 5 enlaces no covalentes. Este región de interacción no covalente preferiblemente no comprende un enlace covalente que une dichos dos o más miembros entre sí. Es evidente que no todos los átomos participan en una interacción no covalente en dicha región. De modo similar, si la región es una región en que están asociados dos (poli)péptidos, no es necesario que todos los aminoácidos participen en la interacción no covalente en dicha región.

55 En la presente, un "monómero" se refiere a una molécula en la que los bloques constituyentes siguen estando covalentemente asociados entre sí cuando se rompen todos los enlaces no covalentes. Los más de un monómeros de un multímero pueden ser iguales o diferentes entre sí.

El término "miembro" se emplea en la presente para indicar una entidad del multímero que está unida de modo no covalente a otro miembro del multímero. Estos dos miembros no están unidos a través de un enlace covalente. Un

miembro es preferible, pero no necesariamente una molécula proteica. Un miembro es general, pero necesariamente un (poli)péptido. Una molécula proteica multimérica de la invención es preferiblemente una proteína multimérica. Una proteína multimérica según la invención comprende preferiblemente un primer miembro que comprende un péptido y al menos un segundo miembro que comprende un (poli)péptido y/o una proteína. Dicho péptido preferiblemente comprende dicho grupo condicionalmente reactivo.

Una molécula proteica comprende al menos dos aminoácidos en unión peptídica entre sí. Generalmente contiene al menos 8 aminoácidos o sus equivalentes funcionales, en enlaces peptídicos entre sí.

En la presente invención, un polipéptido contiene al menos 50 aminoácidos o sus equivalentes funcionales que están unidos entre sí a través de enlaces peptídicos. En este estado no plegado, el polipéptido generalmente es una molécula lineal, pero puede ser (parcialmente) circular. Un péptido generalmente contiene entre 4 y 49 aminoácidos que están unidos entre sí a través de enlaces peptídicos. Preferiblemente, un péptido contiene de 3 a 49 aminoácidos, preferiblemente de 3 a 30, más preferiblemente de 3 a 20 aminoácidos. Un (poli)péptido, tal como se emplea en la presente, puede comprender cualquier aminoácido o cadena de aminoácidos. Un aminoácido puede ser un aminoácido natural o sintético tal como, por ejemplo, un alfa-, beta- o gamma-aminoácido, o superior (omega-aminoácido), es decir, incluye 1, 2, 3 o más espaciamientos de carbonos entre los grupos amino y los ácidos carboxílicos. Un aminoácido (o una cadena de aminoácidos) puede ser un aminoácido (o una cadena de aminoácidos) natural, o un aminoácido (o una cadena de aminoácidos) sintético, o sus combinaciones. Un péptido es un péptido natural o un péptido sintetizado, o sus combinaciones. De nuevo, en su estado no plegado, un péptido es generalmente lineal, pero puede ser (parcialmente) circular. Un péptido generalmente no tiene una estructura terciaria dominante. Generalmente se adapta a una gama de estructuras terciarias. Un péptido, tal como se emplea en la invención, generalmente puede disolverse con facilidad en diversos disolventes. Estos disolventes son, por ejemplo, disoluciones fisiológicas, tales como disolución de cloruro de sodio fisiológica. Un péptido antigénico que es un ligando para una molécula de MHC generalmente tiene entre 8 y 25 aminoácidos que están unidos a través de enlaces peptídicos.

Los (poli)péptidos pueden o no estar modificados. Las modificaciones típicas incluyen las producidas por la maquinaria celular, tales como la adición de glicanos y la fosforilación. Sin embargo, otros tipos de modificaciones también están dentro del alcance de la invención.

Un equivalente funcional de un aminoácido es una molécula que puede reemplazar a uno o múltiples aminoácidos en una cadena de aminoácidos. El equivalente funcional es preferiblemente capaz de formar enlaces con aminoácidos en dos posiciones distintas, de modo que puede formar una parte interna de una cadena de (poli)péptido o de peptidomimético. El equivalente funcional no tiene que tener un homólogo natural. Este equivalente funcional puede incorporarse en un péptido o un (poli)péptido de la invención.

En un aspecto de la presente invención, el enlace covalente que se rompe es preferiblemente un enlace del esqueleto que une a dos aminoácidos o sus derivados/análogos en la cadena de un miembro. La ruptura del enlace covalente se logra preferiblemente incorporando un grupo condicionalmente reactivo en el miembro, preferiblemente un miembro del péptido, en el que debe romperse al menos un enlace covalente. En la presente invención, la expresión "grupo condicionalmente reactivo" se refiere a un grupo reactivo que se incorpora en dicho miembro. El término "condicionalmente" se emplea para reflejar que el grupo reactivo puede activarse condicionalmente, es decir, en respuesta a una señal o activador. El número de grupos condicionalmente reactivos puede variar a voluntad. Un grupo condicionalmente reactivo también puede colocarse en una posición exacta del miembro, por ejemplo, incorporándolo a una cadena (poli)peptídica naciente. En una realización, dicho uno o más grupos condicionalmente reactivos se colocan de modo que el enlace covalente se rompe en una región de interacción no covalente del miembro con al menos otro miembro del multímero. En otra realización, dicho uno o más grupos condicionalmente reactivos se colocan de modo que se altera la conformación preferida del ligando (por ejemplo, miembro), de forma que se reduce la afinidad de la interacción con otros miembros del multímero.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC), que comprende un antígeno peptídico en el surco de unión a péptidos de la molécula de MHC, por lo cual un grupo condicionalmente reactivo está presente en el antígeno peptídico que, cuando se activa por una señal física o química, rompe un enlace covalente dentro de dicho antígeno peptídico, que garantiza la liberación del antígeno peptídico de la molécula de MHC, y en la que dicho grupo condicionalmente reactivo comprende un grupo sensible a la luz o sensible al peróxido.

La ruptura de un enlace covalente en un miembro da como resultado mayor libertad de plegamiento para las cadenas resultantes, reduciendo con ello la fuerza de cualquier interacción no covalente que presenten dicha una o más cadenas resultantes en el multímero. En una realización preferida, dicho miembro se rompe dentro de dicha región de interacción no covalente. Esto produce la mayor reducción de la fuerza de la interacción no covalente en dicha región. El enlace que es roto por dicho grupo condicionalmente reactivo puede seleccionarse colocando de forma apropiada el grupo reactivo en la cadena peptídica. La ruptura de dicho miembro produce cadenas peptídicas de menor tamaño. Se prefiere que el más largo de dichos péptidos resultantes sea al menos 20% y preferiblemente al menos 30% más corto que dicho miembro.

En la presente también se describe una molécula proteica multimérica (un multímero) que comprende al menos dos miembros que se unen entre sí a través de una región de interacción no covalente, en la que al menos uno de dichos al menos dos miembros comprende una cadena (poli)peptídica con un grupo condicionalmente reactivo, y en la que, cuando dicho grupo reactivo se activa, se rompe un enlace covalente dentro de dicho miembro produciendo la ruptura de dicho (poli) péptido en al menos dos (poli) péptidos más pequeños, reduciendo con ello la fuerza de dicha interacción no covalente.

Dicho grupo condicionalmente reactivo comprende un grupo sensible a la luz o sensible a peryodato. La etapa condicional que activa el grupo reactivo es la presencia o la ausencia de luz dentro de un intervalo de longitud de onda definido o la exposición del grupo sensible al peryodato a peryodato. En una realización preferida, dicho grupo reactivo sensible a la luz es un grupo sensible a UV. El grupo condicionalmente reactivo se incorpora preferiblemente en un (poli) péptido. En una realización preferida, dicho grupo sensible a UV comprende ácido 3-amino-3-(2-nitrofenil)propiónico (Carlos J. Bosques y Barbara Imperiali, *Journal of the American Chemical Society*, 2003, vol. 125, pp. 7530-7531). Este aminoácido está disponible en el mercado en Alpha Aesar y debe protegerse con un grupo protector Fmoc para que sea compatible con la síntesis peptídica en fase sólida, u orto-nitrofenilglicina (Alvie L. Davis, David R. Smith y Tommy J. McCord, *Synthesis and microbiological properties of 3-amino-1-hydroxy-2-indolinone and related compounds*, *Journal of Medicinal Chemistry* 1973, vol. 16, pp. 1043-1045), o un equivalente funcional de dichas moléculas. Un equivalente funcional del ácido 3-amino-3-(2-nitrofenil)propiónico es el ácido 3-amino-3-(4-nitrofenil)propiónico. Un equivalente funcional de la orto-nitrofenilglicina es la para-nitrofenilglicina.

En otra realización preferida, dicho grupo sensible al peryodato comprende un resto 1,2-dihidroxi o su equivalente funcional. Existen sistemas alternativos que son equivalentes al sistema de peryodato y 1,2-dihidroxi. Estos sistemas son sistemas de 1-amino-2-hidroxi y polioles, carbohidratos, híbridos de azúcar-aminoácido que contienen un sitio de ruptura de peryodato. Los isómeros peptídicos de dihidroxitileno se describen en Suvit Thaisrivongs, Alfredo G. Tomasselli, Joseph B. Moon, John Hui, Thomas J. McQuade, Steve R. Turner, Joseph W. Strohbach, W. Jeffrey Howe, W. Gary Tarpley, Robert L. Heinrikson, *Inhibitors of the protease from human immunodeficiency virus: design and modelling of a compound containing a dihydroxyethylene isostere insert with high binding affinity and effective antiviral activity*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 1991, vol. 34, pp. 2344-2356; Suvit Thaisrivongs, Steve R. Turner, Joseph W. Strohbach, Ruth E. TenBrink, W. Gary Tarpley, Thomas J. McQuade, Robert L. Heinrikson, Alfredo G. Tomasselli, Joseph B. Moon, John O Hui, W. Jeffrey Howe, *Inhibitors of the protease from human immunodeficiency virus: synthesis, enzyme inhibition, and antiviral activity of a series of compounds containing the dihydroxyethylene transition-state isostere*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 1993, vol. 36, pp. 941-952; e lwao Ojima, Hong Wang, Tao Wang y Edward W. Ng, *New approaches to the asymmetric synthesis of dipeptide isosteres via beta-lactam synthon method*, *Tetrahedron Letters*, 1998, vol. 39, pp. 923-926. La síntesis del ácido 4-amino-4-desoxi-L-treónico (bloque constituyente de aminoácido que contiene diol), que es otro compuesto sensible al peryodato, se describe en James A. Musich y Henry Rapoport, *Synthesis of Anthopleurine, the alarm pheromone from anthopleura elegantissima*, *Journal of the American Chemical Society*, 1978, vol. 100, pp. 4865-4872.

La tecnología puede utilizarse para muchas moléculas proteicas diferentes que interaccionan con ligandos de naturaleza proteica (multímeros). Una proteína multimérica comprende al menos dos miembros, en la que un primer miembro comprende un péptido que comprende dicho grupo condicionalmente reactivo, y en la que un segundo miembro comprende un polipéptido, en la que dicho primer y dicho segundo miembro se unen entre sí a través de una región de interacción no covalente. Preferiblemente, dicha proteína multimérica es una proteína de unión a péptidos, preferiblemente una proteína presentadora de péptidos, y un péptido unido. Los ejemplos de estas proteínas de unión a péptidos son proteínas con dominios SH2-SH3, proteínas de chaperona o moléculas del complejo de inmunocompatibilidad mayor. Los ejemplos de proteínas de chaperona son proteínas de choque térmico. Los ejemplos de estas proteínas de choque térmico son HSP70, gp96, gp110 y calreticulina. Las proteínas de choque térmico cargadas con antígenos (péptidos) se utilizan, por ejemplo, para estimular de modo específico al sistema inmunológico. Esta estimulación específica ayuda a combatir diversas enfermedades, por ejemplo, trastornos provocados por el papilomavirus o cáncer (véase, por ejemplo, Parmiani et al., 2004). Un multímero preferido es una molécula del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). El MHC es reconocido por células T. Las células T desempeñan un papel fundamental en el sistema inmunológico humano y se ha desarrollado una multitud de estrategias para potenciar este sistema de defensa natural y para reforzar la inmunidad frente a patógenos o malignidades. Las células T reconocen a las moléculas de MHC que se han unido a un ligando específico, y los métodos de producción de moléculas de MHC que se han unido a un ligando específico tienen mucho valor. Además, las moléculas de MHC también son reconocidas por una serie de otros receptores que proporcionan más conocimientos para la producción de moléculas de MHC unidas a ligandos. Además, la definición de ligandos asociados a enfermedades, que se unen a las moléculas de MHC, es valiosa para objetivos de diagnóstico y terapéuticos.

Un uso importante de los complejos de ligando-MHC es ilustrado por el hecho de que los complejos de moléculas de MHC ocupadas por ligandos son herramientas muy valiosas en el campo médico para identificar y cuantificar poblaciones de células T específicas y para evaluar el establecimiento de una inmunidad celular eficaz con relación al avance de una enfermedad. Un potencial muy grande para los complejos de MHC recae en el control inmunológico de ensayos clínicos e intervenciones terapéuticas aprobadas. Además, los complejos de MHC pueden aplicarse para aislar células T humanas específicas para una inmunoterapia celular contra patógenos o

malignidades, o para eliminar células T no deseadas de preparación para trasplantes de médula ósea. Además, los complejos de MHC pueden utilizarse para eliminar de forma selectiva poblaciones de células T específicas no deseadas en enfermedades mediadas por células T.

5 Un principal obstáculo para la aplicación eficaz de las moléculas de MHC ocupadas por un ligando definido es la ineficacia de los actuales métodos de producción. La estabilidad de las moléculas de MHC, y en particular las moléculas de MHC de clase I, es baja cuando el antígeno no está unido. Por consiguiente, las moléculas de MHC se producen principalmente en procesos en los que el ligando se une durante el proceso de producción. Se ha utilizado el intercambio de este ligando unido por un ligando elegido, pero este proceso no es eficaz porque la disociación del ligando es lenta bajo condiciones suaves (es decir, un pH cercano al neutro y una concentración salina fisiológica).
 10 La disociación del ligando unido puede estimularse mediante la exposición de las moléculas de MHC a condiciones más duras (por ejemplo, pH ácido o alcalino), pero esto también conduce a la destabilización de la molécula de MHC. Por consiguiente, la tecnología que en la actualidad es la más ampliamente aceptada para la generación de moléculas de MHC recombinantes es la producción separada de un lote de moléculas de MHC ocupadas por el ligando para cada ligando individual. Esto da como resultado un proceso de producción muy largo y caro, que produce lotes pequeños específicos para sólo una aplicación. Para un informe, véase Bakker A.H., Schumacher T.N., MHC multimer technology: current status and future prospects, *Curr. Opin. Immunol.*, 2005, agosto, 17(4):428-33.

Las moléculas de MHC pueden dividirse en dos clases, moléculas de MHC de clase I y de clase II. Ambos tipos de moléculas de MHC pueden unirse a péptidos y presentarlos a células T. Dependiendo de la molécula de MHC, los dominios responsables de la unión al péptido tienen diferentes nomenclaturas. Generalmente se requieren dos dominios para la unión específica a un péptido, según ejemplifican los dominios alfa1 y alfa2 de una molécula de MHC de clase I. Estos dominios se consideran una parte funcional de una molécula de MHC. Por tanto, una parte funcional generalmente contiene dos de los dominios que, en una molécula de MHC, están implicados en la unión a un péptido. Una molécula de MHC natural generalmente contiene varios otros dominios que no están directamente implicados en la unión al péptido. Estos dominios generalmente tienen otras funciones. Por ejemplo, existe un dominio transmembrana o un dominio citosólico. Además, estos dominios pueden desempeñar un papel en la formación de la conformación plegada de los dominios de unión al péptido. Otros dominios pueden ser extracelulares, como los dominios de unión al péptido. Todos estos otros dominios comparten una característica: no están directamente implicados en la unión al péptido. Preferiblemente, dicha molécula de MHC es una molécula de MHC soluble, preferiblemente tal como se describe en Garboczi D.N., Hung D.T., Wiley D.C., HLA-, A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 15 de abril, 89(8):3429-3433.

En una realización preferida, dicha molécula de MHC es un complejo de molécula de MHC.

Un derivado funcional de una molécula de MHC es una molécula que procede de la naturaleza, pero que comparte al menos una propiedad de unión a un péptido con una molécula de MHC en tipo, pero no necesariamente en cantidad. Por ejemplo, las moléculas de MHC modificadas que comprenden una o más diferencias en aminoácidos con respecto a las moléculas de MHC naturales pero que conservan una función de unión a un péptido son derivados funcionales en el contexto de la presente invención. De modo similar, las moléculas que comprenden (partes de) los dominios de unión a péptidos de dos o más moléculas de MHC y que son capaces de unirse a un péptido también se consideran derivados funcionales. Las modificaciones que generalmente se toleran son las que no están en los dominios de unión al péptido. Otras modificaciones o modificaciones que se toleran están en los dominios variables de los dominios de unión al péptido de las moléculas de MHC. Estas modificaciones generalmente alteran la especificidad de unión de la molécula de MHC (es decir, cuál es el péptido que se une). Por tanto, estas modificaciones también se consideran derivados funcionales de las moléculas de MHC de la invención.

45 Varias moléculas comparten las propiedades de unión a péptidos de las moléculas de MHC pero han evolucionado para tener un objetivo diferente en la células. Estas moléculas se consideran análogos funcionales de una molécula de MHC de la presente invención. Los dominios que están implicados en la unión a un (poli)péptido pueden combinarse con estos dominios procedentes de moléculas de MHC. Las moléculas de MHC o sus partes funcionales, derivados y/o análogos también pueden contener otras partes que no están normalmente asociadas con las moléculas de MHC. Estas otras partes pueden comprender, por ejemplo, marcadores, colas, dominios de asociación y/o multimerización y otros elementos.

La tecnología de la presente invención puede utilizarse para destabilizar de modo específico ligandos unidos a moléculas de MHC, o a sus partes funcionales, derivados y/o análogos. La desestabilización de los ligandos unidos a MHC entonces produce la generación de moléculas de MHC sin ligando sin la exposición a condiciones duras. Las moléculas de MHC sin ligando resultantes entonces pueden utilizarse en la forma sin ligando o pueden cargarse con uno o múltiples ligandos elegidos.

Así, en un aspecto preferido de la presente invención, una molécula de MHC comprende un antígeno peptídico (también denominado ligando) en el surco de unión a péptidos de dicha molécula de MHC. El grupo de ataque inducible o el grupo condicionalmente reactivo está presente en el antígeno peptídico, puesto que esto garantiza la liberación del antígeno peptídico desde la molécula de MHC, por lo demás no modificada. Las moléculas de MHC

sin ligando resultantes pueden utilizarse directamente o pueden cargarse con uno o más ligandos diferentes. Para esto, la invención proporciona también una composición que comprende una molécula de MHC de la invención. Esta composición puede proporcionarse con un ligando para ser cargado en la molécula de MHC. Así, también se proporciona una molécula del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC), en la que al menos uno de dichos miembros es un antígeno peptídico en el surco de unión a péptidos de dicha molécula, y en la que dicho antígeno peptídico comprende dicho grupo escindible inducible o grupo condicionalmente reactivo. La composición también puede comprender otro péptido. En una realización preferida, dicho otro péptido es un péptido antigénico capaz de unirse al surco de unión a péptidos de dicha molécula de MHC, es decir, un ligando para dicha molécula de MHC. El grupo de ataque del péptido puede inducirse, produciendo con ello la liberación de los fragmentos peptídicos del multímero. Si el otro péptido también está presente en la composición, este péptido ahora puede tomar el lugar de los fragmentos salientes. La molécula de MHC resultante, o sus partes funcionales, derivados y/o análogos, así se carga con el otro péptido. Por tanto, la composición contiene la molécula de MHC (o sus partes funcionales, derivados y/o análogos) recién cargada y fragmentos del péptido saliente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir una molécula de MHC o un complejo de molécula de MHC que comprende otro péptido, que comprende producir una molécula de MHC que comprende un péptido temporal que tiene un grupo escindible inducible o un grupo condicionalmente reactivos que, cuando se activa, rompe dicho péptido temporal en al menos dos péptidos más pequeños que muestran una menor afinidad de unión por dicha molécula de MHC. Dicho péptido temporal está preferiblemente presente en el surco de unión a péptidos de dicha molécula de MHC o una parte funcional, derivado y/o análogo de dicha molécula de MHC. Dicho método preferiblemente comprende además la activación de dicho grupo escindible o grupo condicionalmente reactivo. Como resultado de la activación, el péptido temporal o saliente se corta en péptidos más pequeños (o aminoácidos), reduciendo con ello la fuerza de la interacción no covalente en la región de la interacción no covalente. Esto permite la fácil retirada del péptido saliente (o sus fragmentos) de la molécula de MHC o sus partes funcionales, derivados y/o análogos. La retirada no requiere condiciones duras y, por tanto, no interfiere o interfiere muy poco con la actividad de la molécula. La molécula de MHC libre puede proporcionarse con un péptido deseado. Utilizando un método de la invención es posible producir grandes cantidades de moléculas de MHC que tienen el péptido saliente. Esta preparación después puede utilizarse para generar moléculas de MHC que comprenden una diversidad de ligandos diferentes (péptidos antigénicos) con un método de la invención. Esto sólo requiere la activación (inducción) del grupo escindible que rompe el péptido saliente, lo cual permite el intercambio con el péptido antigénico deseado. La inducción del grupo escindible o grupo condicionalmente reactivo, la disociación de los fragmentos del péptido saliente y la asociación del péptido deseado con la molécula de MHC o sus partes funcionales, derivados y/o análogos puede realizarse en una etapa. Así, la invención proporciona también un método de la invención que comprende también incubar dicha molécula de MHC o sus partes funcionales, derivados y/o análogos con dicho péptido deseado bajo condiciones que retiran de modo eficaz el péptido temporal de dicha molécula de MHC. También se proporciona un método de la invención, que comprende además detectar la unión de dicho péptido deseado a dicha molécula de MHC. Este aspecto es útil, por ejemplo, para objetivos de diagnóstico. La unión puede detectarse de diversas maneras, por ejemplo a través de anticuerpos o receptores de células T específicos para dicho péptido presentado en el contexto de dicha molécula de MHC. La unión se detecta preferiblemente mediante la detección de un marcador que está asociado con dicho péptido. Esto puede realizarse marcando dicho péptido con una molécula de unión específica, tal como biotina, que después puede visualizarse, por ejemplo, por medio de estreptavidina marcada o sus análogos. En una realización preferida, dicho péptido comprende dicho marcador. De esta manera, cualquier péptido unido a dicha molécula de MHC puede detectarse directamente. La detección de la unión se realiza preferiblemente con objetivos de búsqueda, preferiblemente en un entorno de alta capacidad de procesamiento. Los objetivos de búsqueda preferidos son la selección de compuestos que afecten a la unión de dicho péptido a dicha molécula de MHC. Por ejemplo, los péptidos de ensayo o moléculas pequeñas pueden competir con la unión de dicho péptido a dicha molécula de MHC. La competición puede detectarse mediante la detección de la menor unión de dicho péptido. Un método preferido para detectar la unión de dicho péptido a dicha molécula de MHC se mide mediante anisotropía de fluorescencia. De esta forma, pueden reducirse las manipulaciones de la muestra en la que se está produciendo dicha unión. La reducción en las manipulaciones de la muestra es una propiedad deseada para entornos de alta capacidad de procesamiento. Otros medios preferidos para detectar la unión de dicho péptido son el control de la radiactividad o el control de la unión de un cuerpo de unión dependiente de la conformación de MHC, preferiblemente un anticuerpo o sus partes funcionales, derivados y/o análogos. Otros medios preferidos incluyen el uso de un receptor de células T específico para la combinación de dicho péptido y molécula de MHC. En una realización preferida, se mide la inhibición o la potenciación de la unión de dicho péptido a dicha molécula de MHC. En una realización preferida, dicho método se utiliza para determinar la unión de dicho péptido deseado en presencia de un compuesto de ensayo o de referencia.

Además, la invención proporciona una composición que comprende una molécula de MHC según la invención, en la que dicha composición comprende un complejo de molécula de MHC que comprende un péptido que comprende un grupo condicionalmente reactivo y un complejo de molécula de MHC que comprende otro péptido. Los multímeros de la invención también pueden incorporarse a estructuras aún mayores que también se denominan complejos de multímeros de MHC o tetrámeros de MHC. Estos complejos tienen mayor afinidad por las partículas y las células que portan receptores de células T que por el multímero de MHC individual. Por tanto, estos complejos son herramientas importantes en el análisis de poblaciones de células T. Por tanto, la invención proporciona también un complejo que comprende al menos dos moléculas de MHC de la invención. Los medios y los métodos para producir complejos que

5 contienen dos, tres, cuatro y cinco moléculas de MHC están disponibles en la técnica. Así, la presente invención proporciona también un complejo que comprende dos, tres, cuatro o cinco moléculas de MHC según la invención. En una realización preferida, dichos complejos comprenden moléculas de MHC que tienen la misma especificidad de receptor de células T. Sin embargo, esta necesidad no siempre será el caso. Considerando la relativa facilidad con la que pueden proporcionarse a las moléculas de MHC diferentes péptidos utilizando un método de la invención, los complejos que comprenden dos o más especificidades de receptores de células T están dentro del alcance de la presente invención. La invención proporciona además una superficie sólida que comprende al menos dos moléculas de MHC según la invención, una composición según la invención o una molécula de MHC de la invención. En una realización preferida, a dicha superficie sólida se le proporciona un complejo de la invención, preferiblemente un complejo que comprende un único péptido, o múltiples péptidos asociados con la misma enfermedad o patógeno. La superficie sólida puede ser una esfera. La superficie sólida puede ser una superficie de vidrio o metálica. La superficie puede haber sufrido un pretratamiento antes del revestimiento del multímero, composición o complejo de la invención. Este pretratamiento puede incluir, pero no se limita a un revestimiento de película de poliacrilamida, según se describe en Soen et al. (PLoS Biology, 2003, vol. 1, pp. 429-438). La invención proporciona también una micromatriz que comprende una molécula de MHC, composición o complejo de la invención. Los medios y los métodos para producir una (micro)matriz que comprende un complejo de molécula de MHC acoplado a un péptido antigénico se describen en Soen et al., mencionado anteriormente. Se remite a los expertos en la técnica a dicha referencia como guía para la generación de una (micro)matriz de la invención.

20 También se describe un nuevo epitopo de células T de nucleoproteína de la gripe A en una cepa H5N1. De modo interesante, el nuevo epitopo tiene sustancialmente mayor inmunogenicidad que un epitopo clásico que se encuentra en cepas H5N1 y muchas otras cepas de la gripe A. Además, el nuevo epitopo es compartido por cepas H5N1 de los últimos años, pero es diferente de los de cepas de la gripe A más antiguas, lo cual hace que sea un epitopo más adecuado para objetivos de diagnóstico y terapéuticos presentes y futuros que los epitopos clásicos. Se describen péptidos que comprenden dicha secuencia de epitopo de H5N1. También se describe un péptido aislado y/o sintetizado que comprende la secuencia de aminoácidos AMDSNTLEL. También se describe el uso de un péptido aislado y/o sintetizado que comprende la secuencia de aminoácidos AMDSNTLEL en una vacuna. También se describe el uso de un péptido aislado y/o sintetizado que comprende la secuencia de aminoácidos AMDSNTLEL para la preparación de una vacuna contra la gripe. Dicho péptido, por ejemplo, se presenta al sistema inmunológico de un individuo en una vacuna que comprende dicho péptido y un agente de potenciación inmunológica. También se describe un método para inmunizar a un individuo frente a la gripe, que comprende proporcionar a dicho individuo un péptido aislado y/o sintetizado que comprende la secuencia de aminoácidos AMDSNTLEL, y opcionalmente un agente de potenciación inmunológica y/o un aditivo adecuado. Inmunizar a un individuo, tal como se emplea en la presente, significa que el individuo desarrolla una respuesta inmunológica frente a dicho péptido. También se describe una proteína de fusión que comprende un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos AMDSNTLEL. También se describe un ácido nucleico que codifica dicho péptido AMDSNTLEL o dicha proteína de fusión.

40 También se describe una molécula de MHC que comprende un péptido aislado y/o sintetizado que comprende la secuencia de aminoácidos AMDSNTLEL. Dicha molécula de MHC se emplea para la detección de células T específicas de epitopo. Dicha gripe es preferiblemente H5N1. Un virus de la gripe que se va a diagnosticar es preferiblemente un variante actual de un virus de la gripe. También se describe el uso de dicha molécula de MHC para la preparación de una composición para diagnosticar la gripe. También se describe un método para diagnosticar la gripe en un individuo, que comprende proporcionar a una muestra de sangre de dicho individuo una molécula de MHC, y analizar la unión de dicha molécula de MHC a una célula en dicha muestra de sangre. Dicha célula en dicha muestra de sangre es preferiblemente una célula T. Un método para diagnosticar la gripe en un individuo comprende además detectar una respuesta de células T.

Ejemplos

Métodos

Producción de multímeros de MHC y complejos de multímeros de MHC (tetrámeros de MHC)

50 Se prepararon complejos de MHC de clase I (multímeros de MHC) según se ha descrito previamente, con pequeñas modificaciones (1). Se generaron multímeros de HLA-A2.1-péptido con los siguientes tres péptidos: matriz 58-66 de la gripe A (secuencia GILGFVFTL) y los dos variantes de matriz 58-66 de la gripe a GIL*FVFTL y GILGFVRL*, en los que * es ácido 3-amino-3-(2-nitrofenil)propiónico. Después, los multímeros de péptido-MHC de clase I se purificaron, se biotinilaron con BirA, se purificaron y se conservaron a -20 °C en glicerol al 16%.

Liberación del péptido inducida por UV e intercambio del péptido

55 Los multímeros de MHC, o cuando se indica los complejos tetraméricos de multímeros de MHC, que contienen el epitopo de matriz 58-66 de la gripe A de tipo salvaje, o los variantes G4* o T8* de este epitopo, se expusieron durante 1 hora a UV (CAMAG, 366 nm) en Tris-HCl 20 mM, pH 7,0/NaCl 150 mM/ditiotreitol (DTT) 0,5 mM en presencia o en ausencia de péptidos de unión a MHC de clase I. Después, el complejo se expuso a 37 °C durante 15-45 minutos para inducir la disociación de los complejos de MHC de clase I sin péptido (2). Después las muestras

se analizaron mediante cromatografía de filtración en gel para determinar la disociación de MHC, o se incubaron con estreptavidina marcada con ficoeritrina para generar complejos tetraméricos de multímeros de MHC (tetrameros de MHC). Los tetrameros de MHC se purificaron mediante cromatografía de filtración en gel y se conservaron a -20 °C en glicerol al 16% hasta su posterior uso.

5 Tinción de los tetrameros de MHC

Se incubaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) descongeladas y clones de CTL durante 5 min con tetrameros de MHC marcados con PE a 37 °C, se añadió anticuerpo anti-CD8 marcado con FITC y la incubación continuó durante 15 min a temperatura ambiente. Antes del análisis de FACS, las células se tiñeron con yoduro de propidio para excluir las células muertas. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un FACScalibur y un programa informático CellQuest (Becton Dickinson). Se utilizaron parámetros de dispersión directa y lateral para definir las poblaciones de linfocitos.

Resultados

Formación de multímeros de MHC-péptido que se disocian a voluntad

Para ensayar la viabilidad de generar multímeros de MHC de los cuales puede liberarse a voluntad el péptido unido, los inventores generaron multímeros de HLA-A2.1 con el epitopo de matriz 58-66 de la gripe A de tipo salvaje, o dos variantes de este epitopo en los que el aminoácido 4 u 8 ha sido reemplazado por el beta-aminoácido sensible a UV 3 (figura 1). La formación de multímeros de MHC de clase I resultó eficaz en los tres péptidos, y los multímeros formados se purificaron mediante cromatografía de filtración en gel. Para evaluar si los multímeros de MHC-péptido resultantes pueden inducirse para que se disocien, los tres tipos de multímeros se expusieron a UV, se incubaron a 37 °C para inducir la disociación del resto de moléculas de MHC de clase I sin péptido, y después se analizaron mediante cromatografía de filtración en gel. Mientras que el multímero de MHC-péptido que contiene el epitopo de la gripe A de origen es totalmente insensible a la exposición a UV (figura 2A panel superior), la exposición de los multímeros de MHC de clase I que contienen el epitopo G4* (los datos no se muestran) o T8* (figura 2A panel inferior) conduce a una reducción sustancial en la cantidad de complejo de MHC recuperado. Además, el material remanente consiste, muy probablemente, al menos en parte en cadenas pesadas de MHC de clase I libres, en lugar de multímeros de MHC de clase I-péptido, tal como sugiere el hecho de que el tiempo de elución del material remanente es ligeramente mayor que el del material de partida.

Protección de la disociación de MHC de clase I mediante la adición de péptidos de unión a HLA-A2.1

Para evaluar si la adición de ligandos de unión de MHC de clase I puede proteger la disociación de complejos de MHC sensibles a UV tras la exposición a UV, se realizaron las mismas reacciones en presencia de uno de dos péptidos de unión a HLA-A2.1 (HY 311-319; MART I 26-35 (mutante A2L), o el péptido de unión a HLA-A3 GP100 (614-622)). La adición de cualquier de estos tres péptidos a las moléculas de MHC de clase I que contienen el epitopo de la gripe A de origen no afecta a la recuperación del multímero de MHC de clase I, independientemente de si el multímero se expone a UV, lo cual resulta coherente con la idea de que este multímero de MHC de origen es estable bajo ambas condiciones (los datos no se muestran). De manera importante, aunque la adición del péptido de unión a HLA-A3, que no se espera que interaccione con HLA-A2.1, no conduce a un aumento sustancial de la recuperación del multímero de MHC que contiene péptido G4* (los datos no se muestran) o T8* (figura 2B) sensible a UV, la adición de cualquiera de los péptidos de unión a HLA-A2.1 conduce a un aumento grande en la recuperación (figura 2B). Estos datos son coherentes con la idea de que las moléculas de MHC sin péptido que se generan tras la exposición a UV del multímero de MHC que contiene G4* o T8* pueden unir, de forma eficaz, ligandos de HLA-A2.1 conocidos, pero no un péptido control.

Complejos tetraméricos funcionales de multímeros de MHC generados a partir de multímeros de MHC sensibles a UV

Para establecer directamente si los multímeros de MHC de clase I sensibles a UV, que han sido protegidos mediante la adición de ligandos de HLA-A2.1, han unido estos ligandos, se purificaron multímeros de MHC generados en presencia del péptido MART I 26-35 (mutante A2L), matriz 58-66 de la gripe A, HY (SM-CY) 311-319, o CMV pp65 495-503 y se convirtieron en complejos tetraméricos de multímeros de MHC. Los tetrameros de MHC resultantes después se utilizaron para teñir un clon de células T específico de MART I (figura 3) o células mononucleares de sangre periférica de un donante con células T CD8+ específicas de CMV pp65 495-503 y matriz 58-66 de la gripe A (figura 4). En todos los casos ensayados, los tetrameros de MHC generados tras el intercambio del péptido se unieron a células T específicas de antígeno con igual sensibilidad y especificidad, comparado con los tetrameros de MHC convencionales. Estos experimentos proporcionan pruebas formales de que los multímeros de MHC generados mediante intercambio del péptido son indistinguibles, desde el punto de vista estructural, de los multímeros de MHC-péptido convencionales, y pueden utilizarse para sondar interacciones de pMHC-TCR, en este caso después de la oligomerización.

Tetrameros de MHC funcionales generados a partir de tetrameros de MHC sensibles a UV

Para comprobar si el intercambio del péptido también puede realizarse en complejos tetraméricos de multímeros de

MHC de clase I sensibles a UV, se convirtieron multímeros de MHC que contenían T8* en complejos tetraméricos y después se expusieron a UV en presencia del péptido CMV pp65 495-503, MART I 26-35 (mutante A2L), o HY (SM-CY) 311-319. Los complejos de MHC tetraméricos resultantes después se utilizaron sin más purificación para teñir células mononucleares de sangre periférica de un donante positivo a CMV. De forma notable, los tetrámeros de MHC generados mediante exposición a UV de tetrámeros de MHC que contienen T8* en presencia del epitopo de CMV pp65 495-503 detectaron células T específicas de CMV con igual frecuencia y similar intensidad que los tetrámeros de MHC específicos de CMV pp65 495-503 (figura 5). La especificidad de esta unión se ve subrayada por el hecho de que los tetrámeros de MHC preparados en reacciones paralelas con el péptido MART I 26-35 (mutante A2L) o HY (SM-CY) 311-319 no muestra una unión mensurable a linfocitos CD8+ de este donante.

10 Otros aspectos de la tecnología de intercambio de MHC

Se utilizó la tecnología de intercambio de UV para generar moléculas de MHC que son receptivas a la unión de ligandos que portan un marcador. Las reacciones de intercambio de MHC se realizaron en presencia de un ligando peptídico que se había marcado con un tinte de tetrametilrodamina. Tal como se muestra en la figura 6, el posterior análisis de estas reacciones revela que esta tecnología puede utilizarse para permitir la unión de un ligando marcado, en este caso un péptido fluorescente. Por consiguiente, la tecnología de intercambio de MHC también puede utilizarse para la búsqueda de compuestos (por ejemplo, péptidos y otras moléculas pequeñas) que pueden potenciar o interferir con dicha unión. El principio de dicha búsqueda, que en la presente se ejemplifica utilizando anisotropía de fluorescencia, se resume en la figura 7.

La modificación de péptidos de unión a MHC conocidos permite la generación de ligandos que son sensibles a la ruptura química, y se produjeron variantes del péptido de matriz 58-66 de la gripe A en los que se incorpora un bloque constituyente que contiene diol. Un ejemplo de este ligando modificado se indica en la figura 8. La exposición de dichos ligandos modificados a peryodato conduce a la ruptura de estos ligandos, tal como se ejemplifica en la figura 9.

Análisis

Los datos actuales describen una nueva estrategia para la generación de complejos de MHC que están ocupados con un péptido elegido. La principal limitación para la producción de dichos complejos ha sido la inestabilidad de las moléculas de MHC sin péptido. Por consiguiente, la tecnología que ahora se acepta ampliamente para la generación de moléculas de MHC recombinantes es la producción separada de un lote de moléculas de MHC ocupadas por ligando para cada ligando individual. Esto da como resultado procesos de producción muy largos y caros, que producen lotes pequeños específicos para sólo una aplicación. En la presente, los inventores han demostrado que pueden generarse moléculas de MHC ocupadas por un ligando elegido mediante la liberación selectiva de un ligando previamente unido, mediante la exposición a condiciones que no afectan directamente a la estabilidad del propio complejo de MHC. En el presente conjunto de experimentos, se logró la disociación del ligando unido a MHC mediante el uso de un variante de péptido sensible a la luz. Sin embargo, es evidente que dicha disociación también puede lograrse mediante el uso de variantes de péptidos que sean sensibles a otras condiciones definidas. En particular, el desarrollo de complejos de MHC-péptido empleando variantes de péptidos que son sensibles a la ruptura química parece ser útil en este aspecto. Además, la disociación también puede lograrse sin escisión del péptido, induciendo una menor afinidad del ligando unido por MHC a través de una modificación química o inducida por la luz. Además, aunque la estrategia del intercambio de ligando se ha desarrollado en la presente para moléculas de MHC de clase I, esta estrategia debería ser igualmente útil para preparar moléculas de MHC de clase II ocupadas por ligandos o moléculas de MHC no clásicas (por ejemplo, moléculas de CD1 y Qa1).

Las moléculas de MHC recombinantes generadas a través de la liberación del péptido inducida de modo químico o mediante la luz tendrán una utilidad sustancial para generar las amplias colecciones de complejos de MHC que se emplean en la actualidad en investigaciones clínicas y preclínicas. Además, la capacidad para generar ligandos de MHC ocupados por un ligando deseado mediante un intercambio sencillo debería facilitar en gran medida los esfuerzos para producir moléculas de MHC de calidad GMP que pueden utilizarse para el enriquecimiento o la disminución de células T específicas de antígeno selectivas. Por último, la capacidad para realizar el intercambio del péptido en complejos de MHC preformados constituye una estrategia viable para generar micromatrices de complejos de MHC ocupados por grandes colecciones de antígenos peptídicos. Estas micromatrices de MHC pueden ser herramientas útiles para el análisis de alta capacidad de procesamiento del repertorio de células T específicas de antígeno (3).

Referencias bibliográficas

1. Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., Mc-Michael, A.J., y Davis, M.M., Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, *Science*, 274:94-96 (1996).
2. Schumacher, T.N.M., Heemels, M.-T., Neefjes, J.J., Kast, W.M., Melief, C.J.M. y Ploegh, H.L., Direct binding of peptide to empty MHC class I molecules on intact cells and in vitro, *Cell*, 62, 563-567 (1990).
3. Soen Y., Chen D.S., Kraft D.L., Davis M.M., Brown P.O., Detection and Characterization of Cellular Immune

Responses Using Peptide-MHC Microarrays, PLoS Biol., 1:E65, pp. 429-438 (2003).

4. Parmiani G., Testori A., Maio M., Castelli C., Rivoltini L., Pilla L., Belli F., Mazzaferro V., Coppa J., Patuzzo R., Sertoli M.R., Hoos A., Srivastava P.K. y Santinami M., Heat shock proteins and their use as anticancer vaccines, Clinical Cancer Research, 10, 8142-8146 (2004).

5 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1. Estrategia de fotoescisión: 1A) Estructura de I, el epitopo 58-66 de la gripe A no modificado. 1B) Reacción de fotoescisión. 1C) Estructura de III, el epitopo 58-66 de la gripe A fotoescindible modificado con T8*.

Figura 2. Análisis bioquímico del intercambio del péptido inducido por UV. 2A) Los multímeros de MHC que contienen un ligando sensible a UV son sensibles a la exposición a UV. 2B) Los multímeros de MHC que son sensibles a UV que son expuestos a UV pueden estabilizarse mediante la adición de péptidos de unión a MHC.

Figura 3. Los tetrámeros de MHC generados a partir de multímeros de MHC sensibles a UV tiñen un clon de CTL específico de antígeno. Los multímeros de MHC sensibles a UV se expusieron a UV en presencia de los péptidos indicados y se convirtieron en complejos tetraméricos de multímeros de MHC. Así, los tetrámeros generados que contienen el péptido HY (SM-CY) 311-319 (panel inferior izquierdo) o el péptido MART I 26-35 (mutante A2L) (panel inferior derecho) se utilizaron para teñir un clon de CTL específico de MART I 26-35. Como control, el mismo clon se tiñó utilizando tetrámeros de MHC de clase I clásicos que contienen los mismos epitopos (paneles superiores).

Figura 4. Los tetrámeros de MHC generados a partir de multímeros de MHC sensibles a UV tiñen células T de sangre periférica específicas de antígeno. Los multímeros de MHC sensibles a UV se expusieron a UV en presencia de los péptidos indicados y se convirtieron en tetrámeros de MHC. Así, los tetrámeros generados que contienen el péptido CMV pp65 495-503 (panel inferior izquierdo) o el péptido de la matriz 58-66 de la gripe A (panel inferior derecho) se utilizaron para teñir células mononucleares de sangre periférica de un donante con células T CD8+ específicas de CMV pp65 495-503 y matriz 58-66 de la gripe A. Como control, las mismas PBMC se tiñeron utilizando tetrámeros de MHC de clase I clásicos que contienen los mismos epitopos (paneles superiores).

Figura 5. Los tetrámeros de MHC generados a partir de multímeros de MHC sensibles a UV tiñen células T de sangre periférica específicas de antígeno. Los multímeros de MHC sensibles a UV se expusieron a UV en presencia de los péptidos indicados y se utilizaron para teñir células T específicas de antígeno sin más purificación. Los tetrámeros de MHC que contienen el péptido CMV pp65 495-503 (segundo panel izquierdo) o el péptido MART I 26-35 (mutante A2L) o HY (SM-CY) 311-319 (los dos paneles más a la derecha) se utilizaron para teñir células mononucleares de sangre periférica de un donante con células T CD8+ específicas de CMV pp65 495-503. Como control, las mismas PBMC se tiñeron utilizando tetrámeros de MHC de clase I clásicos que contienen el péptido CMV pp65 495-503 (panel izquierdo).

Figura 6. Perfil de filtración en gel del complejo de péptido/HLA-A2.1 fotolábil antes de la irradiación (1), después de la irradiación sin rescate (2), después de la irradiación en presencia del péptido FLPSDC*FPSV, en el que C* está marcado con un tinte de tetrametilrodamina (3). Panel izquierdo: detección UV a 230 nm. Panel derecho: detección de fluorescencia (excitación 530 nm, emisión 550 nm).

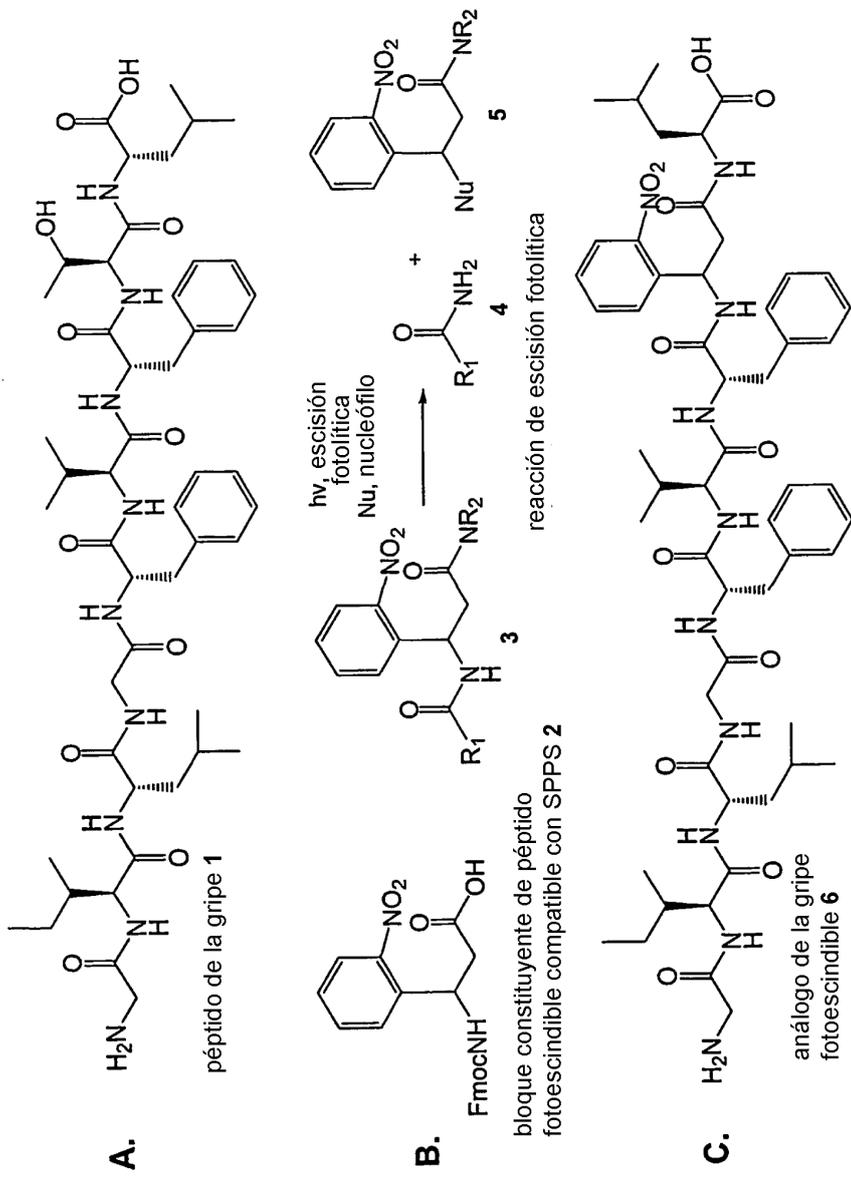
Figura 7. Búsqueda con anisotropía de fluorescencia. Se generan moléculas de MHC sin péptido mediante la escisión del ligando condicional. La unión de un epitopo fluorescente se controla mediante mediciones de anisotropía de fluorescencia o detección de fluorescencia. Mediante este método pueden identificarse ligandos peptídicos o no peptídicos que interfieren o facilitan dicha unión.

Figura 8. Péptido condicional quimioescindible basado en diol y los correspondientes productos de la escisión. La unidad que contiene diol está recuadrada.

Figura 9. Escisión de péptidos de unión a MHC por NaIO₄. Se produjeron variantes del péptido M1 de unión a HLA-A2.1 con un bloque constituyente que contiene diol en la posición 8 (superior) o 4 (no se muestra) mediante síntesis química. Después los péptidos se analizaron mediante LC-MS antes (abajo) o después (arriba) de una exposición durante 1 hr a NaIO₄ 1 mM.

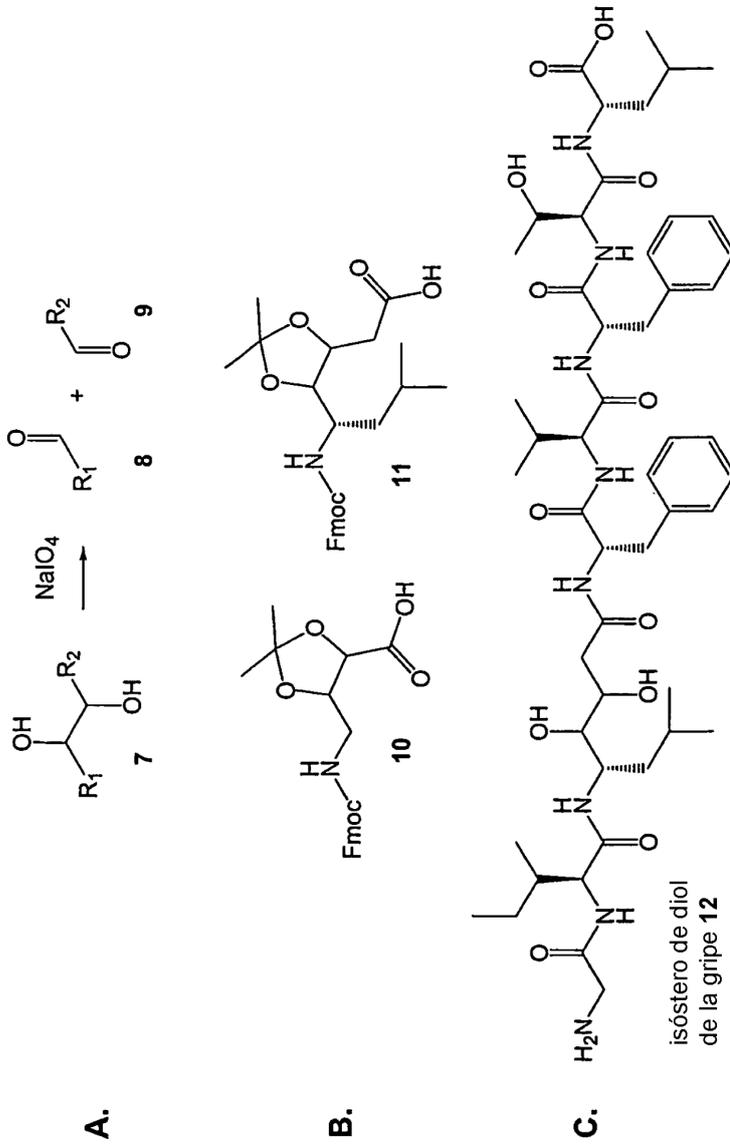
REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una molécula del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC), que comprende un antígeno peptídico en el surco de unión a péptidos de la molécula de MHC, por lo cual un grupo condicionalmente reactivo está presente en el antígeno peptídico que, cuando se activa por una señal física o química, rompe un enlace covalente dentro de dicho antígeno peptídico, que garantiza la liberación del antígeno peptídico de la molécula de MHC, y en la que dicho grupo condicionalmente reactivo comprende un grupo sensible a la luz o sensible al peryodato.
- 2.- La molécula de MHC según la reivindicación 1, en la que dicho grupo sensible a la luz comprende el ácido 3-amino-3-(2-nitrofenil)propiónico o cualquiera de sus equivalentes funcionales.
- 10 3.- La molécula de MHC según la reivindicación 1, en la que dicho grupo sensible al peryodato comprende un resto dihidroxi.
- 4.- Una composición que comprende una molécula de MHC según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 5.- Una composición según la reivindicación 4, que comprende además otro péptido.
- 6.- Una composición según la reivindicación 5, en la que dicho otro péptido es un péptido antigénico capaz de unirse al surco de unión a péptidos de dicha molécula de MHC.
- 15 7.- Un método para producir una molécula de MHC, que comprende a) producir una molécula de MHC que comprende un péptido temporal que tiene al menos un grupo condicionalmente reactivo que, cuando se activa, rompe dicho péptido temporal en al menos dos péptidos más pequeños que muestran una menor afinidad de unión por dicha molécula de MHC, en el que dicho grupo condicionalmente reactivo comprende un grupo sensible a la luz o sensible al peryodato; b) activar dicho grupo condicionalmente reactivo; y c) proporcionar a la molécula de MHC un péptido deseado para su unión al surco de unión a péptidos de dicha molécula de MHC bajo condiciones que retiran de modo eficaz el péptido temporal escindido de dicha molécula de MHC.
- 20 8.- El método de la reivindicación 7, en el que la inducción del grupo condicionalmente reactivo, la disociación de los fragmentos del péptido escindidos y la asociación del péptido deseado a la molécula de MHC se realiza en una etapa.
- 25 9.- Un complejo que comprende al menos dos moléculas de MHC según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 10.- Una superficie sólida que comprende al menos dos moléculas de MHC según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 4-6.
- 11.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7-8, que comprende además detectar la unión de dicho péptido deseado a dicha molécula de MHC.
- 30 12.- Un método según la reivindicación 11, en el que dicha unión se detecta mediante la detección de un marcador que está asociado con dicho péptido deseado.
- 13.- El método según la reivindicación 12, en el que dicho péptido deseado comprende dicho marcador.
- 14.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que dicha unión de dicho péptido deseado a dicha molécula de MHC se mide por medio de anisotropía de fluorescencia.
- 35 15.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, para determinar la unión de dicho péptido deseado en presencia de un compuesto de ensayo o de referencia.



estrategia de fotoescisión: A. péptido de la gripe **1.** **B.** reacción de fotoescisión.
C. péptido de la gripe fotoescindible **6.**

Fig. 1A



escisión del péptido mediada por peryodato oxidativa:

- A.** reacción de escisión.
B. bloques constituyentes compatibles con la síntesis peptídica en fase sólida: aminoácido de dihidroxi protegido **10** e isómero de dipéptido protegido **11**.
C. péptido de la gripe escindible por peryodato desprotegido **12** que contiene el isómero de dipéptido de diol **11**.

Fig. 1B

Disociación del péptido unido a MHC por UV

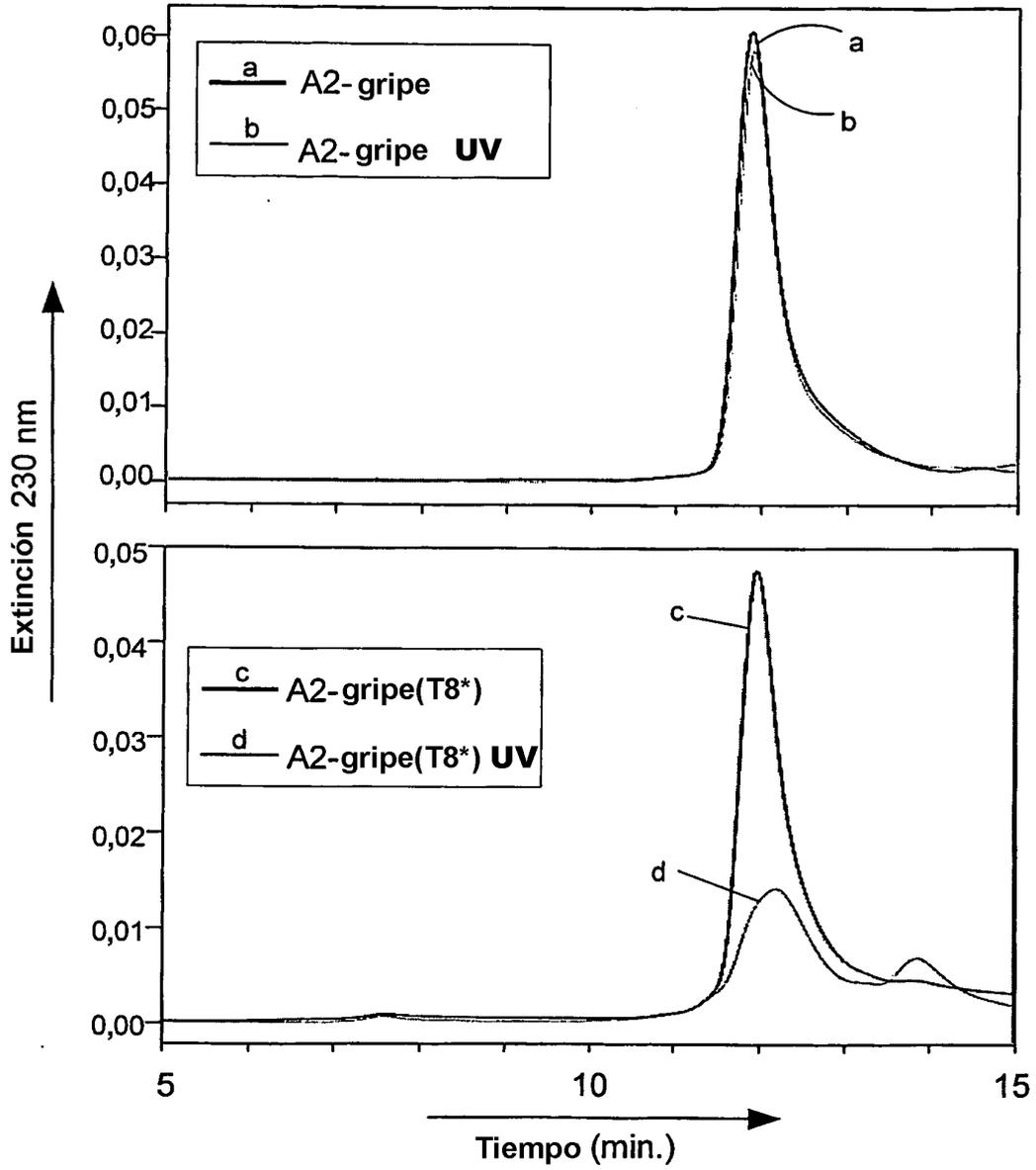
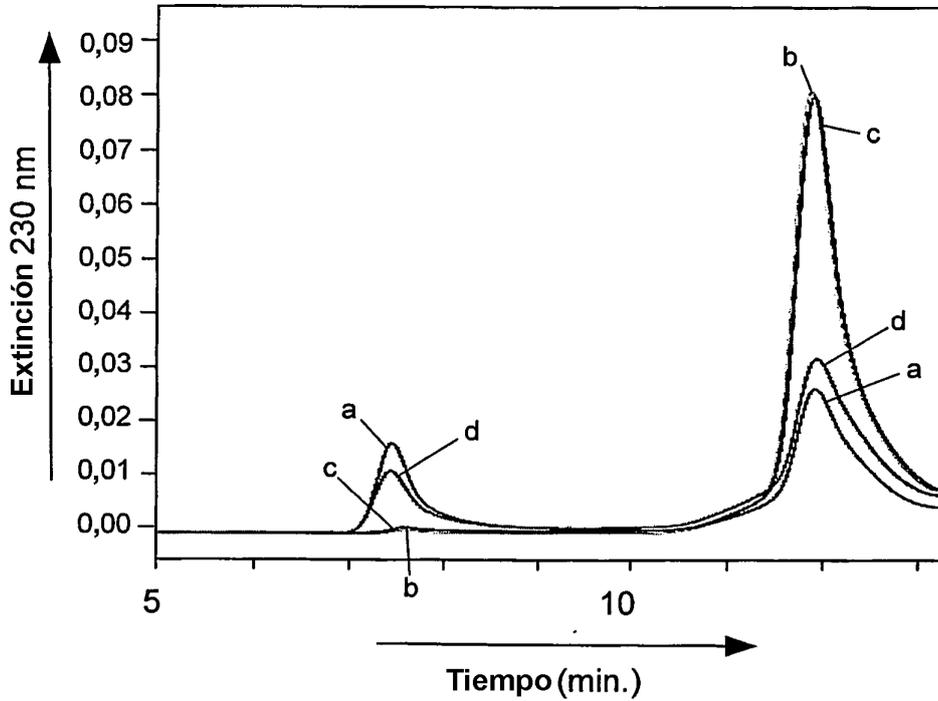


Fig. 2A

Unión de péptidos específicos a MHC vacío



<u>a</u>	gripe(T8*) UV
<u>b</u>	gripe(T8*) UV + MART _{26-35(A2L)} (ligante A2)
<u>c</u>	gripe(T8*) UV + HY ₃₁₁₋₃₁₉ (ligante A2)
<u>d</u>	gripe(T8*) UV + GP100 ₆₁₄₋₆₂₂ (ligante A3)

Fig. 2B

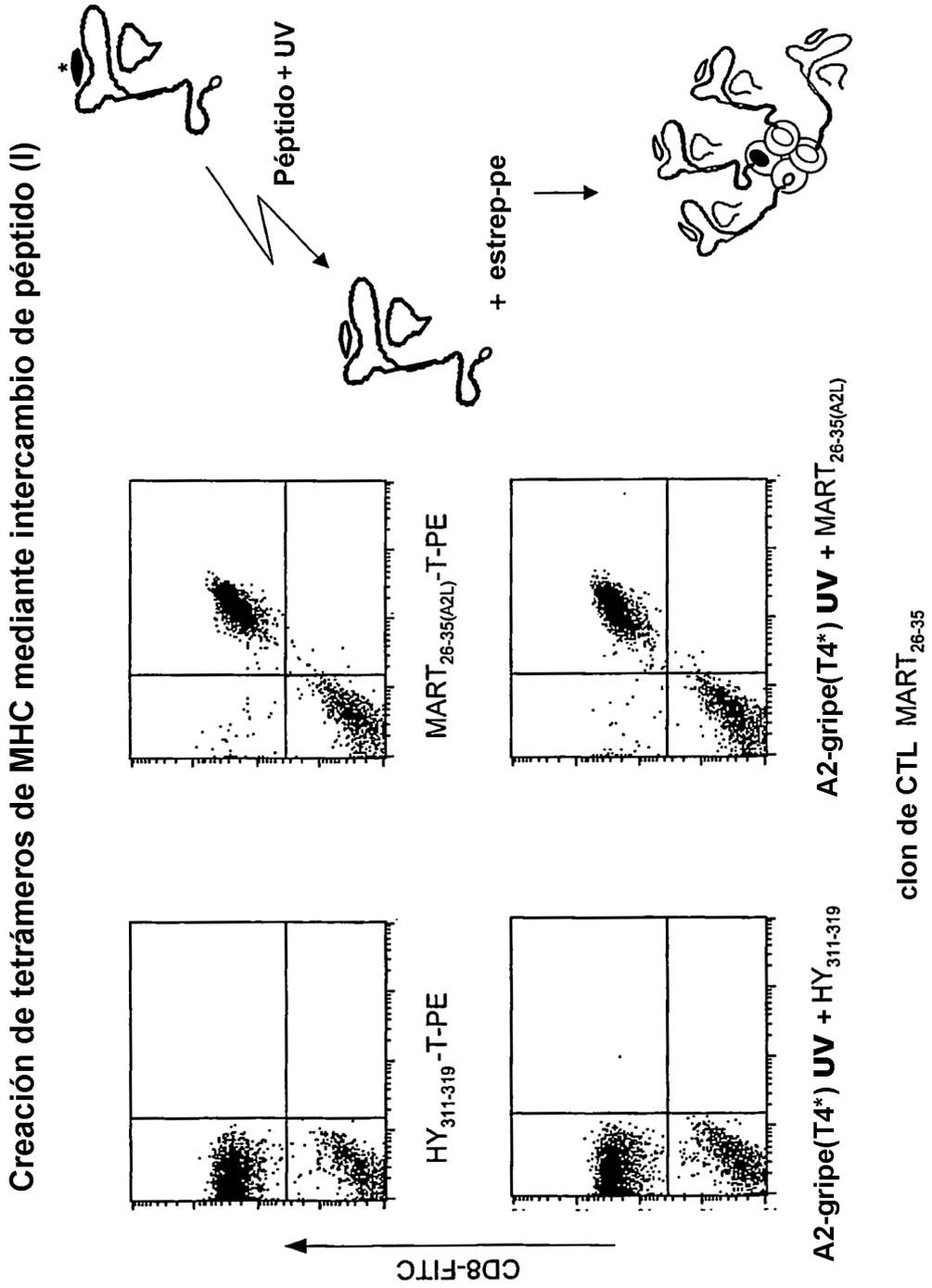


Fig. 3

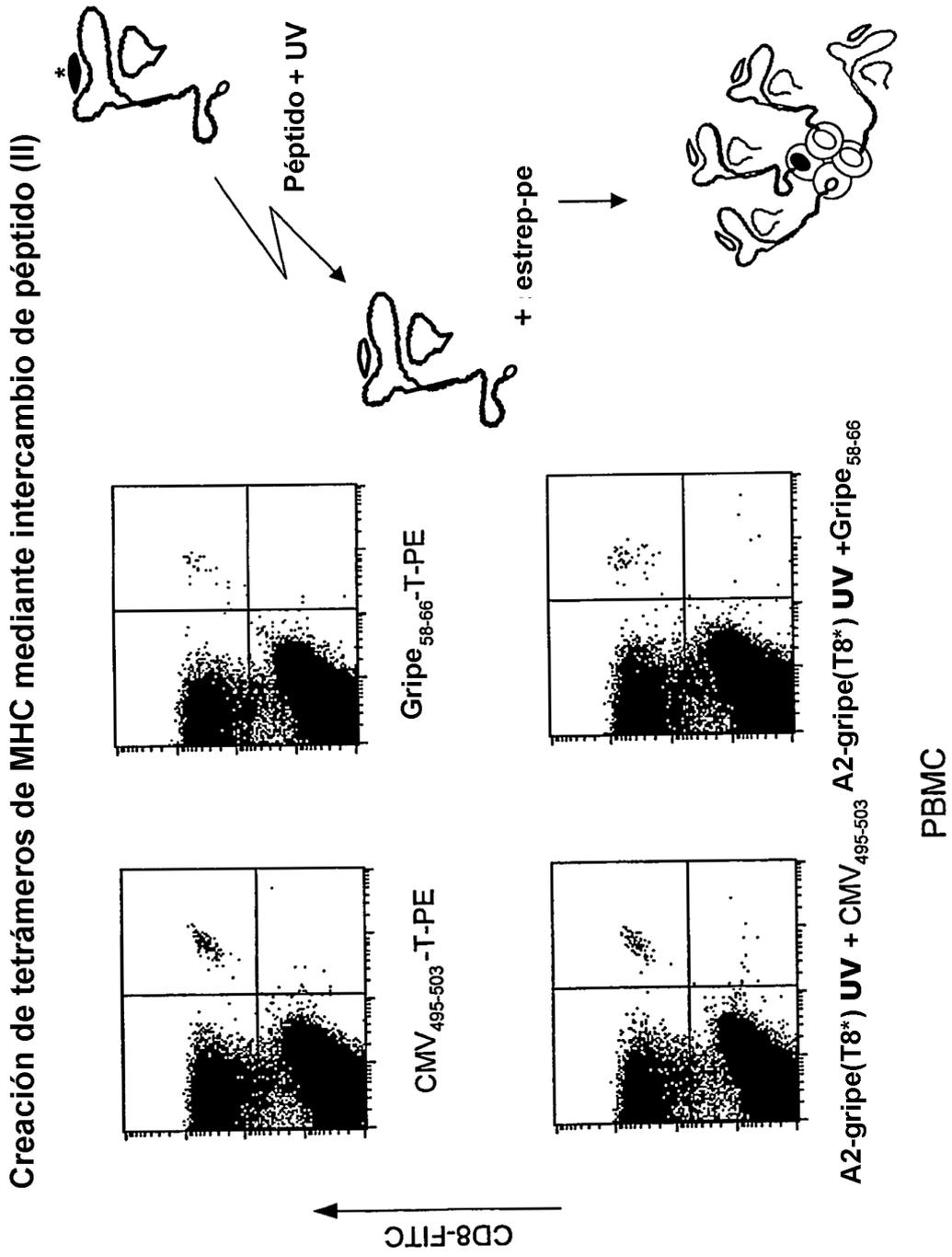


Fig. 4

Creación de tetrameros de MHC mediante intercambio de péptido (III)

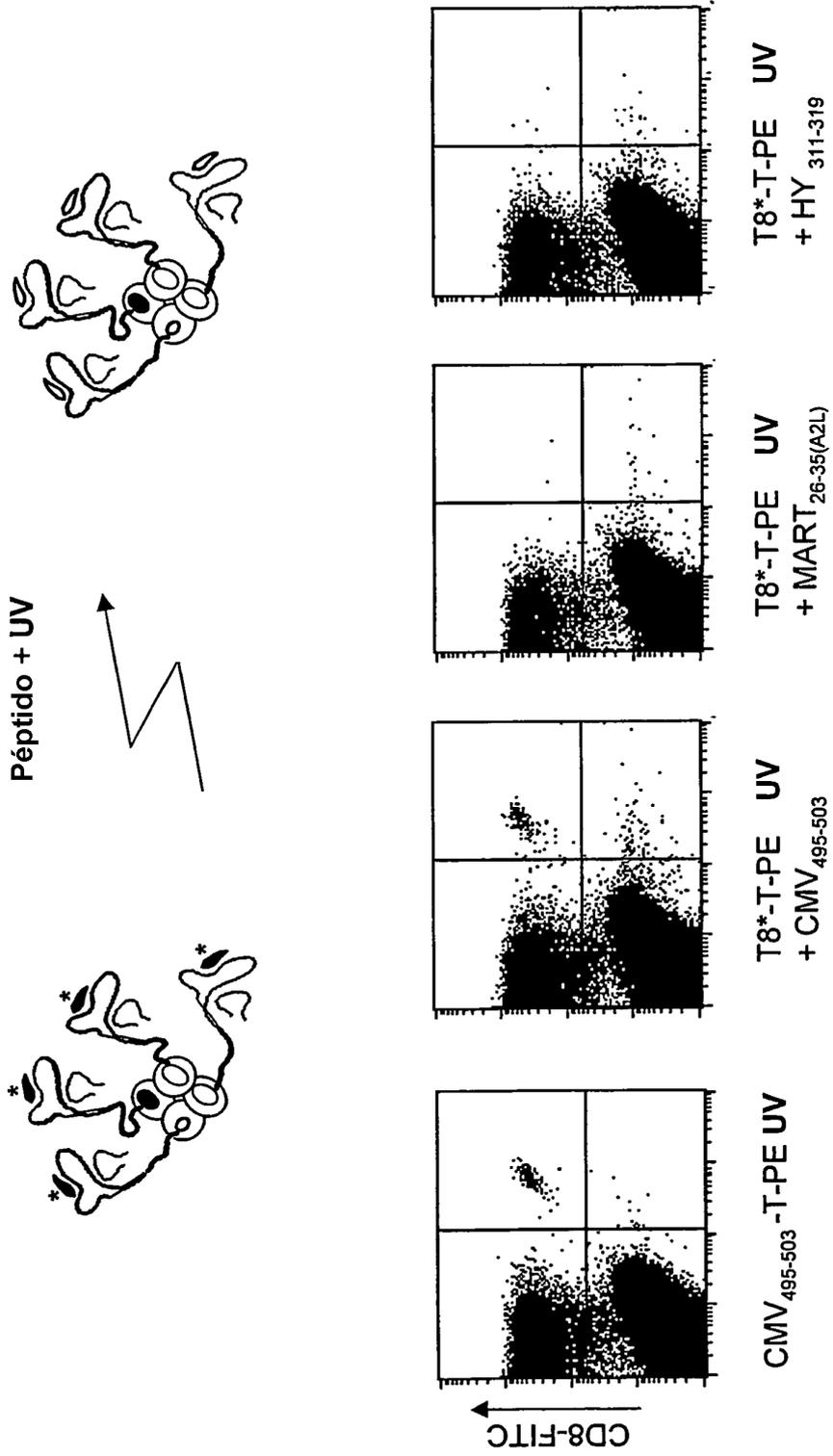


Fig. 5

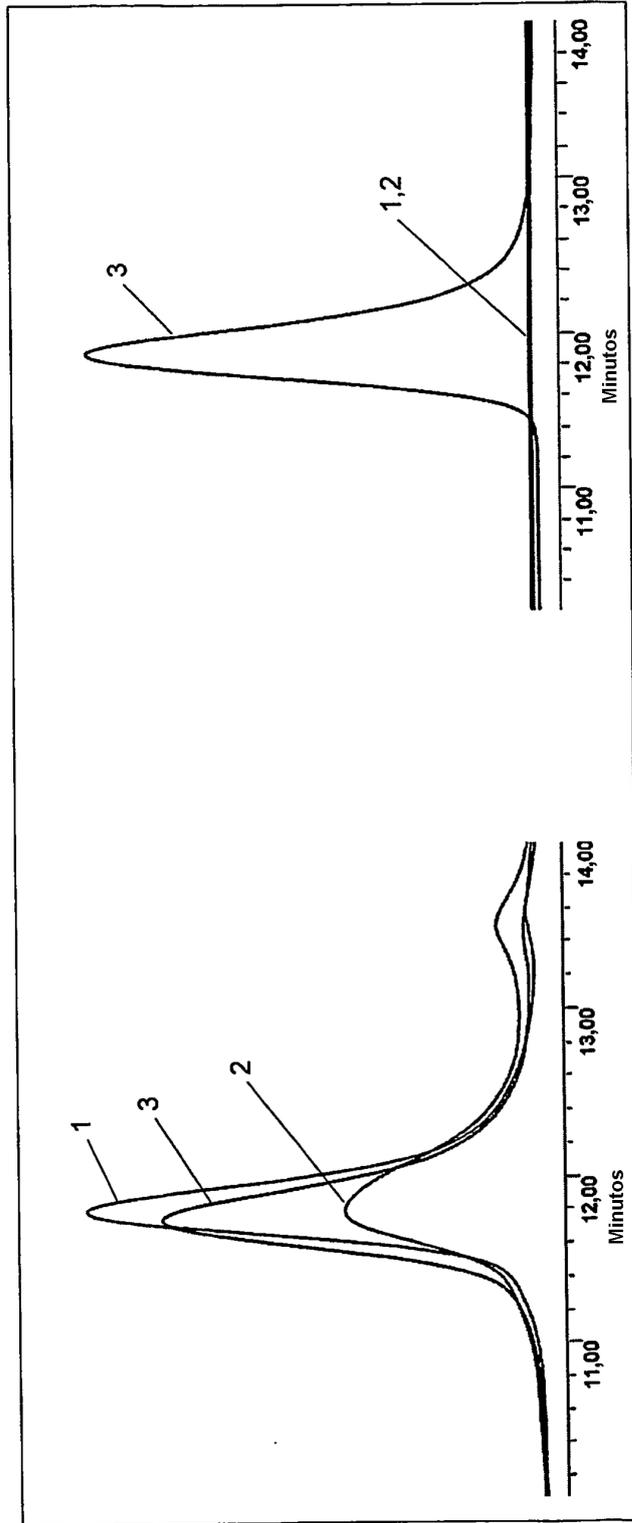


Fig. 6

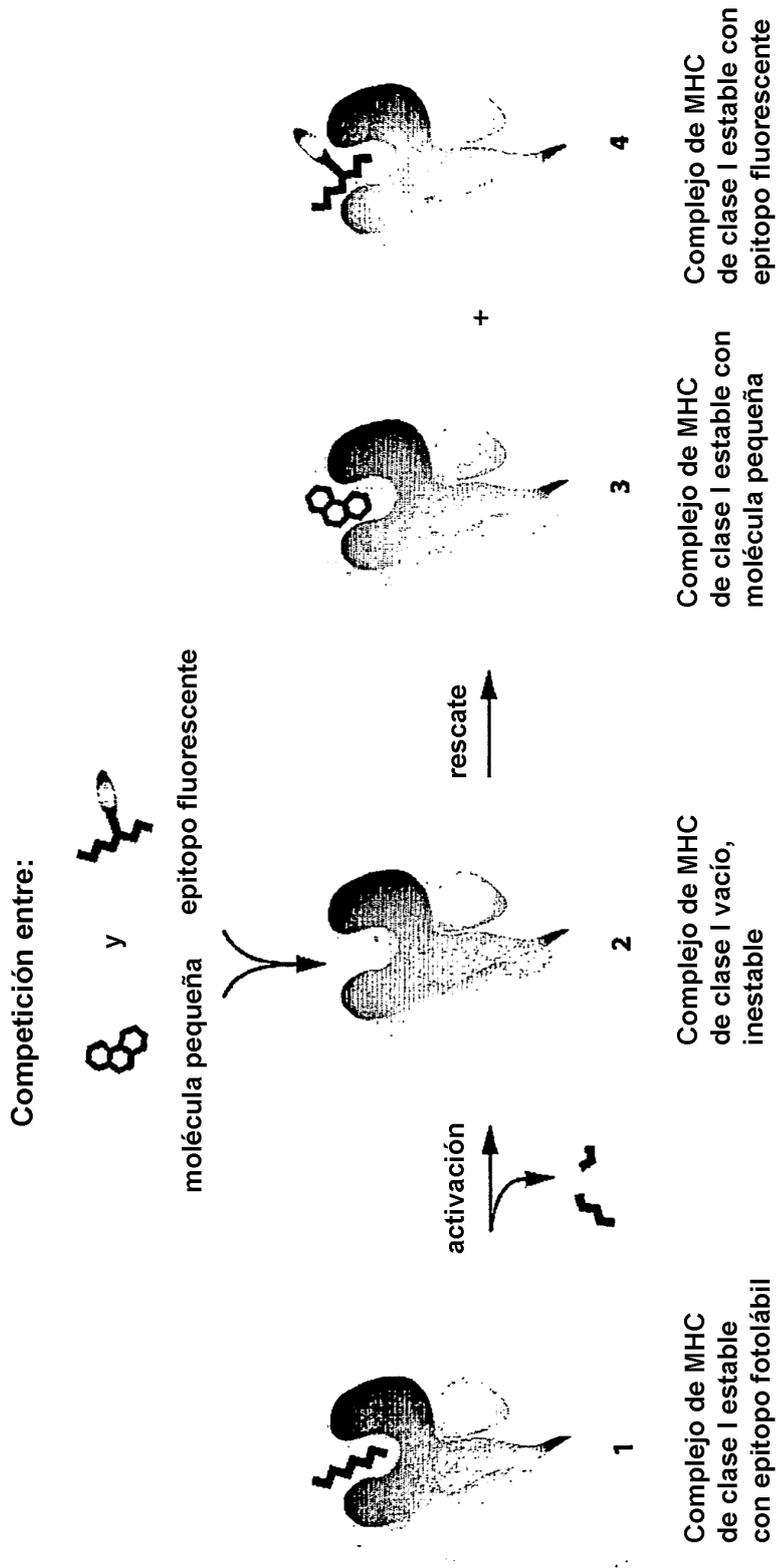


Fig. 7

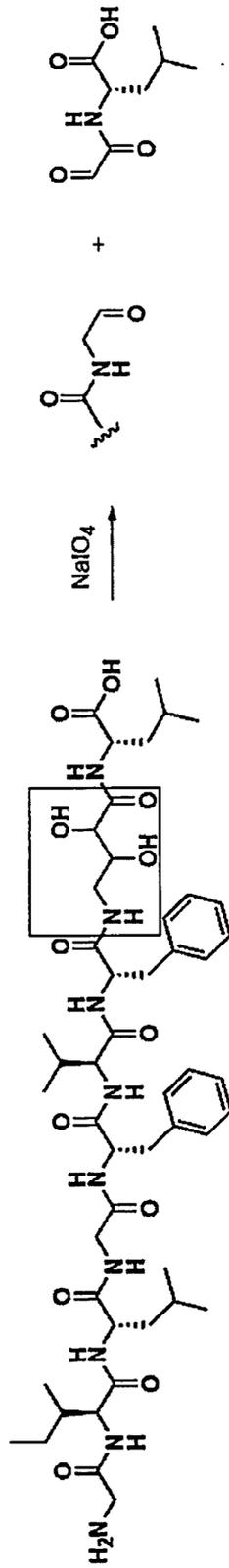


Fig. 8

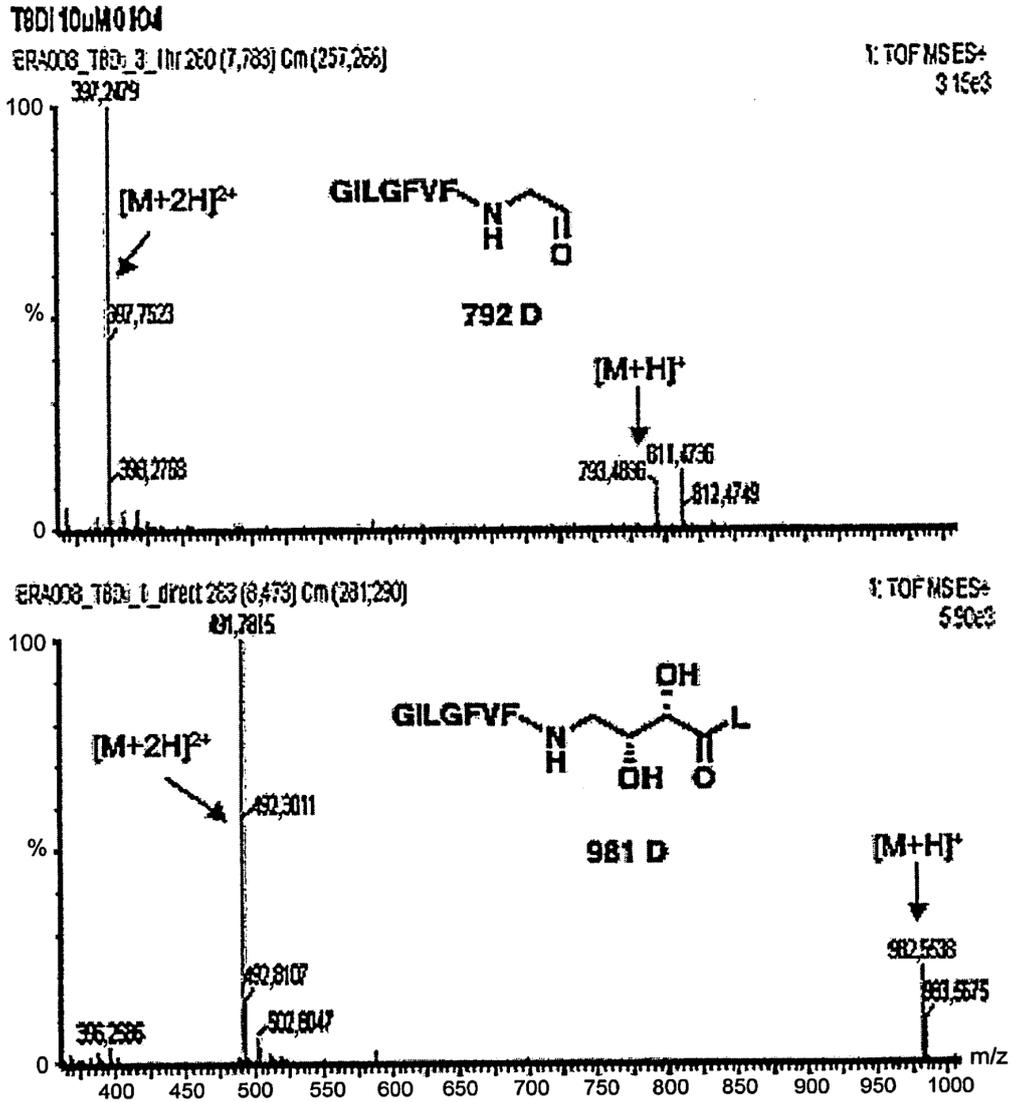


Fig. 9