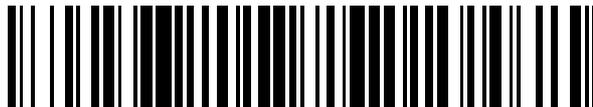


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 059**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2002 E 02706685 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 1377609**

54 Título: **Construcciones de moléculas MHC y sus usos para el diagnóstico y terapia**

30 Prioridad:

14.03.2001 DK 200100435

14.03.2001 DK 200100436

14.03.2001 DK 200100441

14.03.2001 US 275470 P

14.03.2001 US 275448 P

14.03.2001 US 275447 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.10.2015

73 Titular/es:

DAKO DENMARK A/S (50.0%)

Produktionsvej 42

2600 Glostrup, DK y

IMMUDEX APS (50.0%)

72 Inventor/es:

WINTHER, LARS;

PETERSEN, LARS OESTERGAARD;

BUUS, SOEREN;

SCHOELLER, JOERGEN;

RUUD, ERIK y

AAMELLEM, OEYSTEIN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 548 059 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

Construcciones de moléculas MHC y sus usos para el diagnóstico y terapia

La presente invención se refiere al campo de los compuestos poli-valentes que portan ligandos capaces de ligarse a contra receptores en células diana relevantes. Los compuestos poseen varias características ventajosas, que les hacen muy adecuados para un amplio rango de aplicaciones. En particular, la presente invención se refiere a nuevas construcciones de moléculas MHC que comprenden una o más moléculas MHC. La afinidad y avidéz de las moléculas MHC de las construcciones son sorprendentemente altas. La posibilidad de presentar a células diana una pluralidad de moléculas MHC hace de las construcciones de moléculas MHC de la invención una herramienta extremadamente poderosa, por ejemplo, en el campo del diagnóstico. Está comprendido por la presente invención el uso de muestra montada de moléculas MHC, multímeros de moléculas MHC, y construcciones de moléculas MHC. La invención se refiere además en general al campo de la terapia, incluyendo métodos terapéuticos y composiciones terapéuticas. Las composiciones terapéuticas pueden aplicarse tanto in vivo como ex vivo.

Antecedentes de la invención

La unión específica de ligandos a contra receptores en células diana controla muchas respuestas importantes en el organismo humano. Las implicaciones fisiológicas de la unión de ligandos a receptores para hormonas peptídicas, por ejemplo, receptores de insulina (IR) se ha conocido desde hace décadas. Las hormonas peptídicas pueden secretarse de un órgano y ejercer su efecto localmente o ser distribuidas por la sangre a tipos celulares o tejidos localizados a distancia. Nuestro conocimiento actual de las funciones biológicas relacionadas con una variedad de receptores ha surgido a partir de los estudios detallados de la unión de ligando, transducción de la señal y otras medidas de respuestas fisiológicas.

Recientemente, se han descrito interacciones ligando-receptor más complicadas que están relacionadas con la regulación de respuestas inmunes específicas. Por ejemplo, ahora es muy conocido que se requieren las interacciones bioquímicas entre moléculas de membrana específicas de epítipo peptídico codificadas por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, en los seres humanos HLA) y receptores de células T (TCR) para incitar respuestas inmunes específicas. Este tipo de interacción ligando-receptor es de alguna manera más complicada, en comparación con los modelos más "convencionales" ligando-receptor como insulina e IR. La activación de las células T también requiere la señalización simultánea a través de otros receptores, y puede adquirir energía de unión adicional a partir de la unión entre otras moléculas de la membrana, por ejemplo, proteínas de adhesión, para asegurar un contacto físico cercano entre las células implicadas.

El sistema inmune específico (adaptativo) es una red compleja de células y órganos que trabajan conjuntamente para defender al cuerpo específicamente frente a ataques de invasores "extraños" o "no propios". Además, el sistema inmune también comprende una línea de defensa más inespecífica (denominada sistema inmune innato) que consiste en tipos celulares y tejidos, que por medios físicos y químicos proporcionan resistencia frente a invasores extraños.

La red celular del sistema inmune específico es una de las defensas principales del cuerpo frente a la enfermedad. Funciona frente a la enfermedad, incluyendo el cáncer, de varias maneras.

Así, un conocimiento detallado de los mecanismos moleculares que subyacen a la activación del sistema inmune humano puede tener no sólo un efecto profundo e importante para controlar las enfermedades en los seres humanos. Una comprensión detallada también proporcionará herramientas de diagnóstico para controlar infecciones y otras enfermedades en otras especies de vertebrados con importancia económica. Una comprensión detallada proporcionará además la posibilidad de manipular el sistema inmune (tanto in vivo como ex vivo) con el fin de controlar infecciones y otras enfermedades.

Los genes localizados en el locus MHC humano (locus HLA) codifican un conjunto de proteínas de membrana altamente polimórficas que incorporan péptidos en compartimentos intracelulares y presentan dichos epítopos peptídicos a receptores específicos de antígeno (TCR) en las células T. El extenso polimorfismo genético de este locus es la base para la huella genética única del sistema inmune en individuos y define el repertorio de epítopos peptídicos antigénicos que la población humana es capaz de reconocer y a los que responder. Así, las moléculas HLA son jugadores clave para determinar la penetrancia y diseminación de enfermedades humanas. Las moléculas MHC de otras especies de vertebrados superiores ejercen funciones biológicas idénticas a las descritas para HLA en el ser humano.

Para incitar una respuesta completa y adecuada, el sistema inmune adquiere, además de la transducción de la señal que resulta de la interacción específica de péptido de las moléculas MHC y TCR (señal 1), también estímulos por la unión de otras moléculas denominadas co-estimuladoras (señal 2). Ambos grupos de ligandos inmunoactivadores se unen a sus contra receptores específicos con baja afinidad. Por ejemplo, se ha medido que la interacción monovalente MHC-TCR tiene una constante de afinidad de $10\mu\text{M}$ con una vida media correspondiente a pocos minutos. La interacción entre CD28 en células T y las moléculas co-estimuladoras en las células presentadoras de antígeno tiene una afinidad del mismo nivel. La baja afinidad intrínseca ha sido un factor significativo que ha limitado el análisis cuantitativo de las interacciones específicas que se requieren para las respuestas inmunes específicas.

Una tecnología establecida recientemente para producir complejos de de tetrámeros MHC solubles, reportada en primer lugar por Davis y colaboradores en 1996 (ref. 1, Science 274, 94-96 (1996)) ha proporcionado una herramienta para el análisis y detección de la interacción específica entre moléculas MHC y TCR específicas de epítipo en células T en determinadas aplicaciones. Los tetrámeros resultan de moléculas MHC Clase I biotiniladas plegadas en la presencia de un determinante peptídico específico antes de entrecruzarse con estreptavidina. Hasta ahora, se han establecido varios ensayos in vitro e in vivo (ensayo de dilución limitada, ensayo de proliferación, actividad citoquina o citotóxica, ELISPOT y citometría de flujo) para monitorizar respuestas de células T citotóxicas frente a cánceres, enfermedades infecciosas y auto-antígenos. Aunque todavía permanece por definirse la más útil de estas estrategias para predecir la eficacia clínica, por ejemplo, de vacunas de cáncer, existe una alta expectación en el campo acerca del potencial de los tetrámeros. En una estrategia alternativa desarrollada más recientemente, el grupo de Schneck usó inmunoglobulina como un soporte molecular para producir un complejo péptido divalente-MHC-IgG (ref. 2). Numerosos reportes han mostrado que ambos tipos de complejos MHC oligovalentes se unen a células T específicas de antígeno. Se ha demostrado que dichas estrategias son valiosas para usos científicos, prácticos o clínicos.

Sin embargo, los descubrimientos reportados previamente todavía dejan espacio para la mejora. Muchas moléculas MHC son compuestos lábiles que no son fáciles de obtener, necesitan plegarse correctamente para ser funcionales, y tienen una afinidad de unión intrínseca baja para los TCR lo que hace difícil obtener una interacción suficiente con el TCR. Estos obstáculos con los efectos combinados de éstos han resultado en una utilización limitada de la tecnología y usos de multímeros de MHC en muchos laboratorios. Los reportes previos sólo han demostrado la unión de complejos multi-valentes que consisten en 2-4 moléculas MHC de Clase I o II específicas de epítopos peptídicos. La unión de dichos complejos multi-valentes sólo permite la detección de clones de células T de alta afinidad, es decir, excluye una variedad de clones de células T que responden específicamente, por ejemplo, frente a epítopos subdominantes péptido/MHC.

Muchas técnicas, como, por ejemplo, citometría de flujo. ELISA o electroforesis, usan tejido homogeneizado, células o fragmentos celulares. En muchas aplicaciones, sin embargo, es una ventaja importante ser capaz de identificar y estudiar las dianas potenciales en su entorno y alrededores nativos, es decir, en muestras en las que se conserva la morfología. Sin embargo, esto presenta una alta exigencia para los medios usados en la determinación. Los medios deben ser capaces de unirse a la diana de interés cuando la morfología se conserva.

Los beneficios del diagnóstico temprano son extremadamente altos. Cuanto antes se establezca el diagnóstico de una enfermedad o afección grave, mejores son las posibilidades de curación o al menos de control. Sin embargo, esto requiere medios sensibles, específicos y, no menos importante, muy seguros. Esto último es importante, por ejemplo, con el fin de evitar tanto un alto número de resultados falsos positivos como un alto número de falsos negativos.

Un método usado ampliamente para procedimientos de diagnóstico, procedimientos de pronóstico así como monitorización y estratificación de los pacientes es la histoquímica, especialmente la inmunohistoquímica (IHC) (o inmunocitoquímica como se denomina algunas veces). IHC es una herramienta potente para demostrar una variedad de bio-macromoléculas o eventos bioquímicos relacionados in situ, combinado con el estudio de morfología tisular y se ha aplicado extensamente y se está haciendo continuamente en estudios biomédicos y de diagnóstico clínico especialmente para diagnóstico de tumores.

Así, la histoquímica se usa, por ejemplo, para diferenciar entre tumores con patrones histológicos similares, para definir el origen de tumores metastásicos, en el pronóstico de tumores (es decir, detección de procesos neoplásicos tempranos), para identificar recurrencia tumoral y para medir la eficacia de varias terapias.

En aplicaciones de investigación, IHC tiene un papel obvio en la determinación de la distribución citológica e histológica de estructuras biológicas como un análisis complementario y/o confirmativo de resultados a nivel de ADN y ARN.

La presente invención proporciona además herramientas poderosas en el campo de la terapia. El diagnóstico y la terapia son dos campos conectados de cerca. El diagnóstico también engloba determinar o seleccionar la terapia apropiada y óptima. Al volverse los medicamentos más específicos tomando como diana eficazmente variantes específicas de enfermedades (denominados fármacos de diseño), la interrelación entre el diagnóstico y la terapia se vuelve más importante e inseparable. Además, la comprensión creciente del sistema inmune plantea la posibilidad de diseñar medicamentos así como las demandas de éstos.

Un objetivo principal de la inmunoterapia anti-tumoral o anti-vírica es generar células T específicas de antígeno, protectoras de larga vida, que permitan matar a las células diana. Una vez se han aislado las células T específicas de antígeno pueden cultivarse en presencia de moléculas co-estimuladoras. Pueden recubrirse lechos magnéticos, tales como Dynabeads[®], con anticuerpos desarrollados frente a varias moléculas co-estimuladoras, y usarse como APC artificiales para mantener el crecimiento a largo plazo ex vivo de varios subconjuntos de células T. Este cebado y expansión ex vivo de poblaciones de células T efectoras humanas tiene un gran potencial para uso en aplicaciones de inmunoterapia frente a varios tipos de cánceres y enfermedades infecciosas.

Ciertamente, el éxito de las inmunoterapias que interfieren sustancialmente con la función de células ha sido limitado, pero se cree continuamente que ésta sería una forma de tratar un amplio rango de enfermedades graves, incluyendo cáncer y enfermedades auto-inmunes.

5 EP0352761 describe construcciones de antígeno que resultan de la unión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad Clase I a moléculas vehiculares específicas. Las moléculas vehiculares específicas se unen selectivamente a células diana y son preferiblemente anticuerpos monoclonales.

10 WO9626962 describe que las células T pueden marcarse específicamente según su receptor de antígeno mediante la unión de un complejo de unión multimérico. El complejo se prepara con subunidades de proteína del complejo mayor de histocompatibilidad que tienen una población homogénea de péptidos unidos en el sitio de presentación del antígeno. El complejo multimérico MHC-antígeno forma una estructura estable con las células T, permitiendo de esta manera el marcaje, identificación y separación de células T específicas.

15 WO9914236 describe que dos polipéptidos de dominio de MHC son útiles para la manipulación de células T específicas de antígeno. Estos polipéptidos incluyen moléculas basadas en MHC clase II que comprenden dominios beta 1 y alfa 1 unidos covalentemente, y moléculas basadas en MHC clase I que comprenden dominios alfa 1 y alfa 2 unidos covalentemente. Estos polipéptidos también pueden incluir determinantes antigénicos unidos covalentemente, restos tóxicos, y/o marcajes detectables. Los polipéptidos descritos pueden usarse para tomar como diana células T específicas de antígeno.

20 EP0636696 describe un proceso para producir una proteína de antígeno mayor de histocompatibilidad clase II; un material que tiene la MHC clase II inmovilizada en él, preparado uniendo la MHC clase II, las subunidades alfa y/o beta de la MHC clase II, o una parte de éstas a un material tal como un lecho, fibra o hilo hueco a través de unión covalente; y un módulo de eliminación superantígeno preparado del material.

WO9744667 se refiere a métodos para usar complejos MHC/péptido. Más específicamente, se describe un método para aislar, purificar y cuantificar linfocitos T específicos tumorales, de exudado peritoneal y linfocitos infiltrantes de tumor.

25 WO0023053 está dirigida a células presentadoras de antígeno artificiales y métodos para preparar células presentadoras de antígeno artificiales. Dichas células presentadoras de antígeno artificiales pueden usarse en determinados métodos para aislar y expandir poblaciones de células T así como para modular respuestas de células T.

30 WO9805965 se refiere a un método para identificar una o más características de células eucariotas, en particular de mamíferos, caracterizado porque una capa sustancialmente monocelular de una población de células eucariotas se inmoviliza covalentemente en un soporte sólido funcionalizado y porque la capa de células inmovilizadas se somete a una reacción para determinar una característica citológica y/o citogenética de dichas células y porque se evalúa el resultado. La invención también se refiere a un soporte sólido funcionalizado por un espaciador que tiene una función terminal capaz de reaccionar con grupos funcionales presentes en la pared celular.

35 US5312744 se refiere a un método para inmovilizar y conservar una sustancia antigénica inmunológicamente reactiva tal como células antigénicas o antígenos no unidos a células para uso en un inmunoensayo de fase sólida. La sustancia antigénica se adsorbe y entrecruza en un soporte y se pone en contacto con una disolución protectora y que contiene azúcar y sustancia antiséptica.

40 A pesar de los descubrimientos previos reportados, todavía queda mucho espacio para nuevas estrategias. La presente invención ofrece dicha nueva estrategia tanto en el campo del diagnóstico como en el campo de la terapia.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a los aspectos siguientes:

- 45 • Una construcción de moléculas MHC en forma soluble en un medio de solubilización o inmovilizada en un soporte sólido o semi-sólido, comprendiendo dicha construcción de moléculas MHC una molécula vehicular dextrano soluble unida al menos a 5 moléculas MHC, en el que dichas moléculas MHC están unidas a la molécula vehicular dextrano mediante más de una entidad de unión, en el que cada entidad de unión está unida a 2 a 4 moléculas MHC.
- 50 • Una construcción de moléculas MHC en forma soluble en un medio de solubilización o inmovilizada en un soporte sólido o semi-sólido, comprendiendo dicha construcción de moléculas MHC una molécula vehicular dextrano soluble unida al menos a 5 moléculas MHC, en el que dichas moléculas MHC están unidas directamente a la molécula vehicular dextrano y dicha construcción de moléculas MHC comprende uno o más marcadores.
- Una composición que comprende una construcción de moléculas MHC como se ha definido anteriormente en la presente memoria.

- Uso de la composición definida anteriormente en la presente memoria para la fabricación de un medicamento para regular al alza, regular a la baja o modular una respuesta inmune en un animal, para inducir anergia de una célula o para inmunoterapia celular adoptiva.
- 5
- Un método para obtener células que reconocen MHC que comprende poner en contacto una construcción de moléculas MHC como se ha definido anteriormente en la presente memoria y una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC en condiciones mediante las que las células que reconocen MHC se unen a la construcción de moléculas MHC, y aislar la construcción de moléculas MHC y las células que reconocen MHC unidas.
- 10
- Un método para producir una composición como se ha definido anteriormente que comprende proporcionar una construcción de moléculas MHC como se ha definido anteriormente, solubilizar o dispersar la construcción de moléculas MHC en un medio adecuado para sustancias terapéuticas, y opcionalmente añadir otros excipientes.
 - Un método para detectar o monitorizar la presencia de células que reconocen MHC en una muestra que comprende las etapas de
- 15
- (a) poner en contacto una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC con una construcción de moléculas MHC como se ha definido anteriormente, y
 - (b) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, unión que indica la presencia de células que reconocen MHC.
- Un método para establecer un pronóstico de una enfermedad, determinar el estado de una enfermedad o diagnosticar una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de
- 20
- (a) poner en contacto una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC con una construcción de moléculas MHC como se ha definido anteriormente, y
 - (b) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, estableciendo de esta manera un pronóstico de una enfermedad, determinando el estado de una enfermedad o diagnosticando una enfermedad que implica células que reconocen MHC.
- 25
- Un método para determinar la eficacia de un medicamento frente a una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de
- (a) poner en contacto una muestra de un sujeto que recibe tratamiento con un medicamento con una construcción de moléculas de MHC, como se ha definido anteriormente, y
 - (b) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, determinando de esta manera la eficacia del medicamento.
- 30
- Un método para fabricar la composición como se ha definido anteriormente que comprende las etapas de
- (i) proporcionar al menos 5 moléculas MHC;
 - (ii) proporcionar una molécula vehicular dextrano;
 - (iii) proporcionar más de una entidad de unión;
- 35
- (iv) unir dichas al menos 5 moléculas MHC a dicho vehículo dextrano mediante dichas más de una entidad de unión; en el que la unión resulta en que cada entidad de unión se une a de 2 a 4 moléculas MHC;
 - (v) opcionalmente unir una o más moléculas biológicamente activas a dicho vehículo dextrano bien directamente o mediante dichas más de una entidad de unión;
- 40
- (vi) opcionalmente unir uno o más compuestos marcadores a dicha molécula vehicular dextrano, o a una o más de dichas más de una entidad de unión o a una o más de dichas al menos 5 moléculas MHC;
- y fabricar de esta manera la composición como se ha definido anteriormente.

45 Para explotar los potenciales reales de compuestos MHC multi-valentes, se generaron nuevas construcciones de moléculas MHC, que se ha mostrado que poseen numerosas ventajas y así las expectativas para estas nuevas construcciones son altas. Las construcciones de la presente invención pueden expresar potencialmente números muy altos de moléculas MHC (poli-ligandos) siendo ligandos específicos de TCR bien definidos.

En la presente memoria se muestra (véanse los Ejemplos) que estas construcciones de moléculas MHC se unen con una avidéz mucho mayor a células T específicas de antígeno que los tetrámeros conocidos de la técnica anterior en condiciones comparables. La energía de unión inesperada y sorprendentemente incrementada, derivada a través de una mayor valencia de los compuestos, permite la tinción específica y eficiente de poblaciones de células T

incluso sutiles, por ejemplo, en células de sangre periférica, por ejemplo, usando citometría de flujo (véanse los Ejemplos).

5 Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a nuevas construcciones de moléculas MHC que comprenden una molécula vehicular que tiene unida a ella una o más moléculas MHC, estando unidas dichas moléculas MHC a la molécula vehicular bien directamente o mediante una o más entidades de unión.

Las construcciones de moléculas MHC de la invención pueden proporcionarse en forma no soluble o soluble, dependiendo de la aplicación pretendida.

10 Las construcciones de moléculas MHC de la presente invención tienen numerosos usos y son una herramienta valiosa y poderosa, por ejemplo, en los campos del diagnóstico, pronóstico, monitorización, estratificación, y determinación del estado de enfermedades o afecciones así como en terapia. Así, las construcciones de moléculas MHC pueden aplicarse en los diferentes métodos que implican la detección de células que reconocen MHC.

Además, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden las construcciones de moléculas MHC en un medio de solubilización. La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden las construcciones de moléculas MHC inmovilizadas en un soporte sólido o semi-sólido.

15 Las construcciones de moléculas MHC son muy adecuadas como sistemas de detección. Así, la presente invención se refiere al uso de las construcciones de moléculas MHC como se define en la presente memoria como sistemas de detección.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso general de moléculas MHC y multímeros de dichas moléculas MHC en varios métodos con muestra montada. Estos métodos incluyen métodos de diagnóstico, métodos de pronóstico, métodos para determinar el progreso y estado de una enfermedad o afección, y métodos para la estratificación de un paciente.

25 Las construcciones de moléculas MHC de la presente invención también son valiosas en el ensayo de la eficacia esperada de medicamentos frente a o para el tratamiento de varias enfermedades. Así, la presente invención se refiere a métodos para ensayar el efecto de medicamentos o tratamientos, comprendiendo los métodos detectar la unión de las construcciones de moléculas MHC a células que reconocen MHC y establecer la eficacia del medicamento o el tratamiento en cuestión tomando como base la especificidad de las células que reconocen MHC.

30 Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención también se refiere generalmente al campo de la terapia. Así, la presente invención se refiere per se a la construcción de moléculas MHC como se define en la presente memoria para uso como medicamentos, y a las construcciones de moléculas MHC para uso en terapia in vivo y ex vivo.

La presente invención se refiere a composiciones terapéuticas que comprenden como ingredientes activos las construcciones de moléculas MHC como se define en la presente memoria.

35 Un aspecto importante de la presente invención es composiciones terapéuticas que comprenden como ingredientes activos cantidades efectivas de células que reconocen MHC obtenidas usando las construcciones de moléculas MHC como se define en la presente memoria para aislar las células que reconocen MHC relevantes, y expandir dichas células hasta un número clínicamente relevante.

La presente invención se refiere además a métodos para tratar, prevenir o aliviar enfermedades, métodos para inducir anergia de células, así como a métodos para regular al alza, regular a la baja, modular, estimular, inhibir, restaurar, aumentar y/o manipular de otra forma las respuestas inmunes.

40 La invención también se refiere a métodos para obtener células que reconocen MHC usando las construcciones de moléculas MHC como se describe en la presente memoria.

También están englobados por la presente invención métodos para preparar las composiciones terapéuticas de la invención.

Descripción breve de las figuras

45 A continuación se proporciona una descripción breve de las Figuras.

50 Las Figuras 1-24, y 49-57 ilustran algunas realizaciones de las construcciones de moléculas MHC de la presente invención. Las Figuras 49 y 50 ilustran en particular algunas realizaciones de las construcciones de moléculas MHC se proporcionan en forma inmovilizada, aunque las realizaciones mostradas en la Figura 1-24 también pueden proporcionarse en forma inmovilizada. Debe reconocerse que las realizaciones son ejemplos de construcciones de moléculas MHC adecuadas y de ninguna manera debe limitar el alcance de la invención.

La Figura 25-33 ilustran algunas de las aplicaciones de las construcciones de moléculas MHC incluyendo especificidad, efecto de tamaño, tiempo de incubación, dependencia de concentración, curso de tiempo de

disociación de la unión, inhibición de la unión por anticuerpos, efecto de la proporción HLA (MHC humano) a dextrano en la ligación en la unión específica, así como capacidad para teñir subpoblaciones de células T, véanse los Ejemplos. Así, se demuestra la utilidad de las construcciones de moléculas MHC en aplicaciones clínicas prácticas.

- 5 Las Figuras 34-37 muestran restos de unión interesantes de HLA (MHC humano) Clase I y Clase II, proteína VIH/SIV interesante, antígenos interesantes asociados a tumor reconocidos por linfocitos T, y epitopos CTL de VIH.

Las Figuras 38-45 ilustran la utilidad de las construcciones de moléculas MHC en aplicaciones prácticas, véanse los Ejemplos.

- 10 Las Figuras 46-48 ilustran de una manera esquemática cómo las moléculas MHC de las construcciones de la presente invención mimetizan la situación de la vida real, en el que un receptor en una célula se une a una molécula MHC presentada, por ejemplo, sobre una célula infectada.

Figura 1. Resumen de los símbolos usados en las Figuras 2-24. Marcadores directos o indirectos, pareja de entidades de unión, haptenos, anticuerpos, receptores específicos, moléculas MHC, péptidos y polímero.

- 15 Figura 2. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una rellena con un péptido, unidas mediante entidades de unión marcadas a una molécula vehicular.

Figura 3. Construcción de moléculas MHC que comprende diferentes moléculas MHC, rellenas con diferentes péptidos, unidas mediante entidades de unión a una molécula vehicular.

Figura 4. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una rellena con un péptido, unidas mediante las entidades de unión a una molécula vehicular marcada.

- 20 Figura 5. Construcción de moléculas MHC que comprende diferentes moléculas MHC, rellenas con diferentes péptidos, unidas mediante entidades de unión a una molécula vehicular marcada.

Figura 6. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, rellenas con diferentes péptidos, unidas mediante entidades de unión a una molécula vehicular marcada.

- 25 Figura 7. Construcción de moléculas MHC que comprende diferentes moléculas MHC, rellenas con diferentes péptidos, y unidas mediante diferentes entidades de unión a una molécula vehicular. Las entidades de unión están marcadas.

Figura 8. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una rellena con péptido, unidas mediante entidades de unión a una molécula vehicular. Las moléculas MHC están marcadas.

- 30 Figura 9. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una rellena con péptido, unidas directamente a una molécula vehicular. Las moléculas MHC están marcadas.

Figura 10. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una rellena con péptido, unidas directamente a una molécula vehicular. La molécula vehicular está marcada.

Figura 11. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una rellena con péptido, unidas directamente a una molécula vehicular. Los péptidos están marcados.

- 35 Figura 12. Construcción de moléculas MHC que comprende moléculas MHC, rellenas con diferentes péptidos, unidas directamente a una molécula vehicular. Las moléculas MHC están marcadas.

Figura 13. Construcción de moléculas MHC que comprende diferentes moléculas MHC, rellenas con diferentes péptidos, unidas directamente a una molécula vehicular. La molécula vehicular está marcada.

- 40 Figura 14. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una rellena con péptido, unidas mediante entidades de unión que son anticuerpos y/o antígenos específicos a una molécula vehicular. Los anticuerpos/antígenos están marcados.

Figura 15. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una rellena con péptido, unidas mediante entidades de unión que son anticuerpos y/o antígenos específicos a una molécula vehicular. La molécula vehicular está marcada.

- 45 Figura 16. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una rellena con péptido, unidas mediante entidades de unión que son anticuerpos y/o antígenos específicos a una molécula vehicular. Las moléculas MHC están marcadas.

- 50 Figura 17. Construcción de moléculas MHC que comprende diferentes moléculas MHC, rellenas con diferentes péptidos, unidas mediante entidades de unión que son anticuerpos y/o antígenos específicos a una molécula vehicular. Las moléculas MHC están marcadas.

- Figura 18. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una rellena con péptido marcado, unidas mediante entidades de unión que son anticuerpos y/o antígenos específicos a una molécula vehicular.
- 5 Figura 19. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una rellena con péptido, unidas mediante entidades de unión que son anticuerpos y/o antígenos específicos a una molécula vehicular. Anticuerpos secundarios/antígenos marcados se unen a los anticuerpos/antígenos de la entidad de unión.
- Figura 20. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una rellena con péptido, unidas mediante entidades de unión que son anticuerpos y/o antígenos específicos y marcados a una molécula vehicular. Anticuerpos secundarios/antígenos marcados se unen a los anticuerpos/antígenos de la entidad de unión. El marcador puede ser el mismo o diferente.
- 10 Figura 21. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una rellena con péptido, unidas mediante entidades de unión marcadas con hapteno, a una molécula vehicular. Los anticuerpos marcados se unen a los haptenos en las entidades de unión.
- Figura 22. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una rellena con péptido, unidas directamente a una molécula vehicular marcada con hapteno. Los anticuerpos secundarios marcados se unen a los haptenos en la molécula vehicular.
- 15 Figura 23. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, rellenas con diferentes péptidos, unidas directamente a una molécula vehicular marcada con hapteno. Los anticuerpos secundarios marcados se unen a los haptenos en la molécula vehicular.
- Figura 24. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples y diferentes moléculas MHC, cada una rellena con péptido, unidas directamente a una molécula vehicular marcada con hapteno. Los anticuerpos secundarios marcados se unen a los haptenos de la entidad de unión.
- 20 Figura 25. Análisis de citometría de flujo de la unión de construcciones de moléculas MHC poli-ligando específicas de MART-1 de la invención y tetrámeros de moléculas MHC específicos de MART-1 a clones de células T específicos. Los datos se presentan como intensidad de tinción de células T viables como una función de concentraciones crecientes de construcciones de moléculas MHC poli-ligando y tetrámeros de moléculas MHC, respectivamente. La Figura 25A muestra la especificidad en la unión de tetrámeros PE-A2-MART-1 a los clones de células T específicos de MART-1 y gp100 5/127 y 5/130. La Figura 25B muestra el efecto del tamaño de la molécula vehicular en la unión de construcciones de moléculas MHC poli-ligando A2-MART-1 FITC al clon de células T 5/127.
- 25 Figura 26. Análisis de citometría de flujo de la unión de construcciones de moléculas MHC poli-ligando y tetrámeros de moléculas MHC a una línea de células T específica de influenza que ilustra la tinción específica y dependiente de la dosis. Figura 26A: Unión de tetrámeros marcados con PE a una línea de células T específica de influenza. Figura 26B: Unión de construcciones de moléculas MHC poli-ligando marcadas con FITC a una línea de células T específica de influenza.
- Figura 27. Análisis de citometría de flujo comparativo de la tinción dependiente de tiempo y concentración por construcciones de moléculas MHC poli-ligando de la invención y tetrámeros de moléculas MHC al clon de células T 5/127. Figura 27A: Unión dependiente de tiempo de los tetrámeros MART1-A2 marcados con PE a concentraciones de tetrámero de 14 a 112 nM. Figura 27B: Unión dependiente de tiempo de construcciones de moléculas MHC poli-ligando MART1-A2 marcadas con FITC a concentraciones de 2 a 16 nM.
- 30 Figura 28. Análisis de citometría de flujo del efecto de la temperatura en la disociación de construcciones de moléculas MHC poli-ligando A2-MART-1 de la invención unidas a células del clon de células T 5/127. El efecto se estudió a 4°C, 22°C y 37°C, respectivamente.
- Figura 29. Análisis de citometría de flujo de la inhibición de la unión de la construcción de moléculas MHC poli-ligando A2-MART-1 al clon de células T 5/127 por anticuerpos monoclonales dirigidos frente a la proximidad del sitio de unión del péptido. Figura 29A: Se ensayó el efecto de los anticuerpos siguientes: BB7.2, específico de HLA A0201; W6/32, específico general de HLA A, B, C; BBM1, específico de β_2m . Todos los anticuerpos se usaron a una concentración de 10 nM. bck: Valor de fondo, -mab: sin tratamiento con anticuerpo. Figura 29B: Ensayo de concentraciones crecientes de los dos anticuerpos monoclonales: anticuerpo BBM1 (específico de β_2m) y anticuerpo anti-CD8 de células T humanas de ratón.
- 45 Figura 30. Análisis de citometría de flujo de la unión de la construcción poli-ligando HLA Clase I al clon de células T 5/127 que muestra el efecto de variaciones en la proporción HLA a dextrano en el proceso de ligación. Se ensayaron los dextranos de 150, 270 y 500 kDa.
- Figura 31. Diagrama de citometría de flujo que muestra el análisis de una subpoblación de células T específica del péptido A2-MART-1 de 5% teñida con: (A) molécula MART-1/HLA tetrámero marcada con PE a una concentración de 15 nM. (B) construcción de moléculas MART-1/HLA poli-ligando marcada con FITC a una concentración de 3 nM.
- 55

La población de células T se obtuvo mezclando los dos clones de células T 5/127 (específico de MART-1) y el 5/130 (específico de gp100).

5 Figura 32. Diagrama de citometría de flujo que muestra la tinción de la construcción de moléculas MHC poli-ligando de (A) células T específicas de MART-1 (clon 5/127) y (B) gp100 (clon 5/130). En cada caso, sólo el 1% de la población de células T fue positivo mimetizando el nivel de células T positivas encontrado típicamente en muestras de pacientes. La población de células T se obtuvo mezclando los dos clones de células T 5/127 y 5/130 a las proporciones relevantes.

10 Figura 33. Ensayo de unión que muestra el efecto de la presencia/ausencia de 10 nM anticuerpos monoclonales en la unión de la construcción de moléculas MHC poli-ligando yodada (β_2m marcado con ^{125}I) que presentan A2-MART-1 al clon de células T 5/127 (específico de MART-1). Se usaron los anticuerpos siguientes: BMM1 (específico de β_2m humano); W6/32 específico general HLA A, B, C); y BB7.2 (específico de HLA-A0201). Ctrl 5/130: Línea celular control negativo 5/130.

La Figura 34 indica restos de unión interesantes de moléculas HLA Clase I y Clase II.

La Figura 35 indica proteínas interesantes de VIH/SIV.

15 La Figura 36 indica antígenos asociados a tumor interesantes reconocidos por linfocitos T.

La Figura 37 indica epítomos CTL de VIH interesantes.

20 Figura 38. Tinción fluorescente in situ de células T en biopsias, tomadas de diferentes lesiones de cáncer de mama, con anticuerpo CD8 marcado y construcciones de moléculas MHC poli-ligando. Figura 38A: Tinción con anticuerpo CD8 marcado con Cy3 (fotografía de la izquierda), construcción de molécula HLA A0201 poli-ligando péptido análogo de survivina marcado con fluoresceína (fotografía de la derecha) en biopsias de paciente positivo para HLA A2, y las fotografías fusionadas (fotografía del centro). Figura 38B: Tinción con el anticuerpo CD8 marcado con Cy3 (fotografía de la izquierda), construcción de molécula HLA A0201 poli-ligando péptido análogo de gp100 sin sentido marcado con fluoresceína (fotografía de la derecha) en biopsias de paciente positivo para HLA A2, y las fotografías fusionadas (fotografía del centro). Figura 38C: Tinción con anticuerpo CD8 marcado con Cy3 (fotografía de la izquierda), construcción de molécula HLA A0201 poli-ligando péptido análogo de survivina marcado con fluoresceína (fotografía de la derecha) en biopsias de paciente negativo para HLA A2, y las fotografías fusionadas (fotografía del centro).

30 Figura 39. Tinción fluorescente in situ de células T en biopsias, tomadas de lesiones de melanoma y nódulos linfáticos, con anticuerpo CD8 marcado y construcciones de moléculas MHC poli-ligando. Carril superior: Tinción con anticuerpo CD8 marcado con Cy3 (fotografía de la izquierda), construcción de molécula HLA A0201 poli-ligando péptido análogo de survivina marcado con fluoresceína (fotografía de la derecha) en lesiones de melanoma de paciente positivo para HLA A2, y las fotografías fusionadas (fotografía del centro). Carril inferior: Tinción con anticuerpo CD8 marcado con Cy3 (fotografía de la izquierda), construcción de molécula HLA A0201 poli-ligando péptido análogo de survivina marcado con fluoresceína (fotografía de la derecha) de nódulo linfático de paciente positivo para HLA A2 y las fotografías fusionadas (fotografía del centro).

35 Figura 40. Tinción fluorescente in situ de células T con anticuerpo CD8 marcado con PE (fotografía de la izquierda), construcción de molécula HLA A0201 poli-ligando péptido MART-1 marcado con fluoresceína (fotografía de la derecha) de lesiones de melanoma de paciente positivo para HLA A2, y las fotografías fusionadas (fotografía del centro).

40 Figura 41. Tinción fluorescente in situ de diferentes poblaciones de células T en biopsias de la piel del sitio de inyección de inmunización con anticuerpo TCR VB12 marcado y construcciones de moléculas MHC poli ligando péptido MART-1 o MAGE-3. Figuras 41A, 41B y 41C: Tinción con anticuerpo TCR BV12 marcado con Cy3 (fotografías de la izquierda), construcción de molécula HLA A0201 poli-ligando péptido MART-1 marcado con fluoresceína (fotografías del centro), y las fotografías fusionadas (fotografías de la derecha). Figura 41D: Tinción con anticuerpo TCR VB12 marcado con Cy3 (fotografía de la izquierda), construcción de molécula HLA A0201 poli-ligando péptido MAGE-3 marcado con fluoresceína (fotografía del centro), y las fotografías fusionadas (fotografía de la derecha).

50 Figura 42. Tinción fluorescente in situ de células T en biopsias de la piel del sitio de inyección de inmunización de epítomo del péptido gp100 con anticuerpo CD8 y construcciones de moléculas MHC poli ligando. Figura 42A: Tinción con anticuerpo CD8 marcado con Cy3 (fotografía de la izquierda), construcción de molécula HLA A0201 poli-ligando péptido MAGE-3 sin sentido marcado con fluoresceína (fotografía del centro), y las fotografías fusionadas (fotografía de la derecha). Figura 42B: Tinción con anticuerpo CD8 marcado con Cy3 (fotografía de la izquierda), construcción de molécula HLA A0201 poli-ligando péptido gp100 marcado con fluoresceína (fotografía del centro), y las fotografías fusionadas (fotografía de la derecha).

55 Figura 43. Fotografía de microscopio de campo brillante de una tinción in situ con cromógeno AEC de células T en tejido de melanoma positivo para HLA A0201 con construcción de moléculas MHC marcada con HRP poli-ligando

análogo de péptido MART-1 (ELAGIGILTV). Se usaron diferentes reactivos de bloqueo de peroxidasa endógena. Figura 43A: disolución peróxido/metanol, y Figura 43B: disolución de bloqueo de peroxidasa DAKO. Las células positivas se colorean de rojo.

5 Figura 44. Efecto de construcciones de moléculas MHC poli-ligando o combinadas con proteína MIC A en la liberación de IFN-gamma de las células T. Las células se incubaron con la construcción de moléculas MHC durante los periodos indicados antes de la medida de IFN-gamma en los sobrenadantes. El clon de células T no secretó IFN-gamma cuando se incubó con la construcción de moléculas MHC que presentaba un péptido irrelevante.

10 Figura 45. Fotografía de microscopio de campo brillante de linfocitos T citotóxicos (CTL) reactivos con survivina aislados de un nódulo linfático infiltrado con melanoma usando lechos magnéticos. Figura 45A: Los CTL reactivos para el péptido survivina se aislaron/formaron rosetas con Dynabeads® recubiertos con un complejo recombinante HLA A0201/péptido survivina. Figura 45B: Se usan Dynabeads® recubiertos con un complejo recombinante HLA A0201 /péptido de influenza como control negativo.

15 Figura 46. Los péptidos y proteínas extraños se presentan al aparato inmune a través de moléculas MHC expuestas en la superficie de las células. Algunas células reconocen y se unen a la molécula MHC en complejo con un péptido presentado en la superficie de las células. Dichas células (células que reconocen MHC) "prueban" las diferentes combinaciones molécula MHC/péptido. Si el receptor en la célula que reconoce MHC puede unirse al complejo molécula MHC/péptido, entonces puede inducirse una cascada de respuestas celulares.

20 La Figura 47 ilustra cómo la molécula MHC en complejo con un péptido se ajusta a un receptor por una célula. Cada molécula MHC de las construcciones MHC de la invención actúa como la célula exponiendo un complejo molécula MHC/péptido. Así, puede identificarse la presencia de células específicas, concretamente aquellas que tienen un receptor que reconoce la combinación específica molécula MHC/péptido.

La Figura 48 ilustra cómo las moléculas MHC de las construcciones de moléculas MHC de la invención pueden verse como una "cadena de perlas". Las construcciones de moléculas MHC se unen con alta avidéz a receptores en las células que reconocen MHC.

25 La Figura 49 muestra una realización de la presente invención en la que la construcción de moléculas MHC de la invención comprende moléculas HLA rellenas con péptido. Aquí, la construcción de moléculas MHC se acopla (o inmoviliza) directamente en un soporte sólido o semi-sólido en este caso lechos o partículas.

30 La Figura 50 muestra una realización de la presente invención en la que la construcción de moléculas MHC de la invención comprende moléculas HLA rellenas con péptido así como molécula co-estimuladora, por ejemplo, CD80 o CD86. Aquí, la construcción MHC de la presente invención se acopla (o inmoviliza) directamente en un soporte sólido o semi-sólido en este caso lechos o partículas.

35 La Figura 51 muestra una realización de la presente invención en la que la construcción de moléculas MHC de la invención comprende moléculas HLA rellenas con péptido. Aquí, la construcción MHC de la presente invención se acopla (o inmoviliza) en un soporte sólido o semi-sólido en este caso lechos o partículas usando una unión de anticuerpo a la molécula vehicular.

La Figura 52 muestra una realización de la presente invención en la que la construcción de moléculas MHC de la invención comprende moléculas HLA rellenas con péptido y moléculas co-estimuladoras. Aquí, la construcción MHC de la presente invención se acopla (o inmoviliza) en un soporte sólido o semi-sólido en este caso lechos o partículas usando una unión de anticuerpo a la molécula vehicular.

40 La Figura 53 muestra una realización de la presente invención en la que la construcción de moléculas MHC de la invención comprende moléculas HLA rellenas con péptido. Aquí, la construcción MHC de la presente invención se acopla (o inmoviliza) en un soporte sólido o semi-sólido en este caso lechos o partículas por una pareja de unión biotina-avidina.

45 La Figura 54 muestra una realización de la presente invención en la que la construcción de moléculas MHC de la invención comprende moléculas HLA rellenas con péptido y moléculas co-estimuladoras. Aquí, la construcción MHC de la presente invención se acopla (o inmoviliza) en un soporte sólido o semi-sólido en este caso lechos o partículas mediante biotina-avidina.

50 Figuras 55, 56, y 57. En el caso de que las células T sólo reciban una señal a través del complejo TCR/CD3, esta señal puede inducir apoptosis de las células T. En principio, esto puede ocurrir durante el procedimiento de separación en el que las células T pueden ponerse en contacto por lechos magnéticos que portan construcciones de moléculas MHC. La apoptosis puede evitarse o reducirse proporcionando a las células T una señal co-estimuladora durante el procedimiento de aislamiento de las células. Las construcciones poli-ligando según moléculas MHC y moléculas co-estimuladoras comprometerían la especificidad del aislamiento de las células. Con el fin de evitar o reducir esto, el aislamiento de las células T puede realizarse con construcciones de moléculas MHC inmovilizadas en lechos en presencia de anticuerpos o ligandos co-estimuladores conjugados con construcciones de moléculas

55

MHC solubles (Figura 55), en presencia de anticuerpos o ligandos co-estimuladores conjugados con otra fase sólida o semi-sólida (Figura 56), o en presencia de anticuerpos o ligandos co-estimuladores solubles (Figura 57).

Descripción detallada de la invención

5 Con el fin de explicar mejor la presente invención, se proporciona a continuación una descripción de algunas características importantes del sistema inmune y las moléculas MHC.

El sistema inmune y las moléculas MHC

10 El sistema inmune puede verse como uno de los sistemas bioinformáticos naturales principales. Evalúa cualquier sustancia que entra en el entorno interno, determina su naturaleza y decide si actuar frente a ella. Las proteínas y péptidos son los medios más importantes para obtener y transportar dicha información inmune. Desde este punto de vista, la molécula MHC codifica el grupo más esencial de moléculas requeridas para el reconocimiento de antígenos inmunogénicos. Las moléculas MHC muestrean el metabolismo proteico completo para información peptídica y hacen que esta información esté disponible para la unidad de reconocimiento central del sistema inmune, la célula T. Sin embargo, estas células efectoras requieren una interacción sustancial entre la molécula MHC y los TCR para mantener las al menos dos señales que se requieren para la activación de células T sin estimular: Una señal surge por la interacción molecular entre las moléculas MHC y TCR, mientras la otra señal deriva de la ligación de ligandos co-estimuladores, por ejemplo, B7-1 y sus contra receptores, por ejemplo, CD28. También se ha mostrado que otras moléculas, por ejemplo, receptores NK, pueden regular el umbral de activación de las células T. Así, la activación completa de las células T y otras células efectoras inmunes competentes requiere una acción orquestada de múltiples ligandos; se podría decir que las respuestas inmunes están bajo el control de compuestos poli-ligando.

20 La función del sistema inmune es proteger al cuerpo frente a invasores extraños o moléculas propias aberrantes (por ejemplo, parásitos, bacterias, virus y cáncer). Dichas amenazas pueden eliminarse o neutralizarse normalmente eficazmente por el sistema inmune. Para administrar este potencial, el sistema inmune debe discriminar moléculas normales en el cuerpo sano de la presencia de moléculas extrañas o propias aberrantes, que pueden expresarse durante la génesis de enfermedades, por ejemplo, cáncer. Idealmente, las moléculas extrañas o aberrantes deben eliminarse, mientras el cuerpo en sí mismo debe dejarse sin daño. Un distintivo principal del sistema inmune es, por lo tanto, una de especificidad, es decir, la capacidad de discriminar entre varias dianas y en particular distinguir entre lo propio y no propio. El sistema inmune específico- o adaptativo- implica un gran número de diferentes tipos celulares. Las respuestas inmunes se desarrollan a partir de una interacción orquestada de células procesadoras de antígeno/células presentadoras de antígeno y células efectoras. Las células efectoras centrales son linfocitos, con una subdivisión principal en células B y T que representan las respuestas humoral y celular, respectivamente. Ambas poblaciones de células usan receptores, que en su genoma están codificados en muchos bits y partes lo que permite una enorme diversidad recombinatoria de los receptores. Cada célula B o T porta uno, y sólo uno, de estos receptores que reconocen sus mínimos pero únicos fragmentos del universo. Todos los linfocitos humanos combinados dividen el universo entero en dos grupos principales de dianas: un grupo de antígenos propios que son tolerados por el sistema inmune y un grupo de antígenos no propios o aberrantes que pueden incitar una respuesta. La especificidad global del sistema inmune se genera, regula y coordina a través de procesos que controlan linfocitos individuales. La delección, o inactivación, de un clon de linfocitos elimina la especificidad correspondiente del repertorio. La activación y propagación de un clon de linfocitos aumenta la especificidad correspondiente- y permite al sistema inmune responder rápidamente y fuertemente frente al antígeno.

40 Las células del sistema inmune

Las células del sistema inmune incluyen las siguientes: Los linfocitos son un tipo de células sanguíneas blancas que se encuentran en la sangre y muchas otras partes del cuerpo. Los tipos de linfocitos incluyen células B, células T, y células Asesinas Naturales (NK).

45 Las células B y T reconocen y responden específicamente a sustancias aberrantes, siendo parte así del sistema inmune específico.

Las células B (linfocitos B) maduran en células plasmáticas que secretan anticuerpos (inmunoglobulinas), las proteínas que reconocen y se unen a sustancias extrañas conocidas como antígenos. Cada tipo de célula B produce un anticuerpo específico, que reconoce un epítipo específico en el antígeno.

50 Las células T reconocen y responden frente a sustancias aberrantes por interacción con células presentadoras de antígeno (APC) que presentan antígenos en la forma de péptidos "no propios" (o aberrantes) en el contexto de las moléculas MHC. Cada clon de células T expresa una única especificidad de receptores de células T (TCR), que reconoce un epítipo específico péptido/MHC.

55 Las células T comprenden dos subpoblaciones principales. Las células T citolíticas atacan directamente células infectadas, extrañas, o cancerosas que presentan formas extrañas o aberrantes de péptidos endógenos en el contexto de las moléculas MHC Clase I (descrito más adelante). Las células T "auxiliares" que se activan por péptidos exógenos extraños en las moléculas MHC Clase II, contribuyen a la regulación de la respuesta inmune

mediante la señalización de otros defensores del sistema inmune. Las células T también funcionan produciendo proteínas denominadas linfoquinas.

5 Las células NK producen sustancias químicas potentes que se unen a y matan a cualquier invasor extraño. Atacan sin tener que reconocer en primer lugar un antígeno específico, siendo así un tipo de célula inmune que también está relacionado con el sistema inmune innato.

10 Los monocitos son células sanguíneas blancas que son capaces de engullir y digerir organismos y partículas microscópicas en un proceso conocido como fagocitosis y procesamiento de antígeno. Las células dendríticas (DC) tienen un interés particular ya que presentan epítopos peptídicos de una "manera profesional" que da lugar a la activación efectiva de las células T. La APC profesional expresa una variedad de moléculas co-estimuladoras que se unen a una variedad de contra receptores expresados en las células T.

15 Las células en el sistema inmune secretan dos tipos de proteínas, concretamente anticuerpos y citoquinas. Los anticuerpos específicos detectan epítopos en antígenos específicos, ajustándose conjuntamente de la misma manera en la que una llave se ajusta a una cerradura. Las estrategias de vacuna convencionales, en particular, funcionan a través de la activación de células T auxiliares y células B dando lugar a la secreción de anticuerpos específicos de antígeno.

Las citoquinas son sustancias producidas por algunas células inmunes para comunicarse con otras células. Los tipos de citoquinas incluyen linfoquinas, interferones, interleuquinas, y factores estimuladores de colonias.

Reconocimiento de antígeno por células B y T

20 Las células B y T usan mecanismos completamente diferentes para reconocer a sus dianas. Las células B reconocen antígenos solubles, y como pueden secretar sus receptores como anticuerpos, pueden interactuar potencialmente con el antígeno a lo largo de la fase fluida del espacio extracelular. En contraste agudo, el receptor de las células T está siempre unido a la membrana y sólo reconoce antígeno, que está presentado en la membrana de una célula presentadora de antígeno (APC). En otras palabras, el reconocimiento de las células T implica una interacción física directa entre dos células, una célula T y una APC. Las células B y T también se diferencian respecto a lo que reconocen. Las células B pueden reconocer sustancias orgánicas de casi cualquier clase, mientras las células T reconocen predominantemente proteínas (como una diana biológica, las proteínas son particularmente importantes ya que constituyen la base estructural y funcional de toda vida). Las células B reconocen la estructura tridimensional de proteínas como se ilustra por su capacidad de distinguir entre proteínas nativas y desnaturalizadas. Por el contrario, las células T no pueden distinguir entre proteínas nativas y desnaturalizadas. Hoy, sabemos que las células T sólo reconocen péptidos antigénicos presentados en asociación con moléculas MHC en la superficie de las APC. En general, las células T citotóxicas reconocen péptidos cortos (correspondientes en general a 8-11 residuos), cuyos extremos amino y carboxi están incluidos profundamente en la molécula MHC Clase I (es decir, la longitud del péptido está restringida). En comparación, las células T auxiliares tienden a reconocer péptidos más largos (correspondientes en general a 13-30 residuos) con extremos amino y carboxi terminales extendiéndose fuera de la molécula MHC Clase II.

Restricción de MHC e inmunidad de células T

40 Las células T determinan la reactividad y especificidad del sistema inmune adaptativo, incluyendo la actividad de las células B. Por lo tanto, es apropiado centrar la atención en estas células. Las células T sólo pueden reconocer un antígeno dado, cuando se presenta en el contexto de una molécula MHC particular. Se "educan" durante la ontogenia y se activan adicionalmente durante el primer cebado en procesos designados para desarrollar células T que portan receptores específicos para una combinación particular antígeno-molécula MHC. Estas células T posteriormente sólo son capaces de reconocer la misma combinación antígeno-molécula MHC. Este fenómeno se conoce como "restricción de MHC". Otro fenómeno inmune - el de "estado respondedor"- también se determina por las moléculas MHC. Los individuos de un haplotipo MHC responderán a algunos antígenos, y no a otros. Otros individuos con otros haplotipos MHC responderán de manera diferente. Estos dos fenómenos tienen una importancia obvia para cualquier manipulación inmune racional. Como se ha mencionado, ahora sabemos que las moléculas MHC controlan a ambos. Estas moléculas han evolucionado específicamente para el propósito de la presentación de antígeno. Nuestro conocimiento actual de la presentación de antígeno puede resumirse como sigue. En primer lugar, la sustancia extraña, el antígeno, es captado por las APC. Se genera un conjunto intracelular de péptidos antigénicos mediante la fragmentación proteolítica de todas las proteínas disponibles para la célula (que puede incluir tanto proteínas celulares normales ("proteínas propias") como antígenos ("proteínas no propias") de los organismos infectivos.

55 Este conjunto de péptidos se ofrece a las moléculas MHC del individuo y se muestrean según la longitud y secuencia; algunos se unen, mientras otros se ignoran (se dice que la molécula MHC realiza "selección determinante"). Posteriormente, las moléculas MHC protegen a los péptidos seleccionados frente a degradación adicional, los transportan a la superficie de la APC y los exponen para el escrutinio de las células T. Los péptidos antigénicos de "proteínas no propias", a diferencia de péptidos de "proteínas propias", son reconocidos por las células T que consecuentemente se activan.

Una pluralidad de receptores están implicados en la activación específica de antígeno de las células inmunes

Varias interacciones ligando-receptor relacionadas con el control de esta red de células son complejas, en comparación con los modelos ligando-receptor más "convencionales" que comprenden una simple interacción hormona-receptor, por ejemplo, insulina e IR.

- 5 Por ejemplo, la activación completa de las células T adquiere una señalización simultánea a través de una variedad de receptores además de la señalización de TCR. La energía de unión producida a partir de la ligación de múltiples moléculas de membrana expresadas en células APC y T, asegura un contacto físico cercano entre las células implicadas. Uno de los receptores adicionales más importantes relacionado con la activación de las células T es moléculas CD28, que se unen a proteínas de la familia B7 expresadas en APC profesionales. Otros ejemplos
10 conocidos de receptores reguladores expresados en las células T son una variedad de receptores NK (NKR), que comprenden isoformas tanto inhibidoras como activadoras. Se cree que el equilibrio entre formas expresadas de NKR activadores e inhibidores determina un umbral para la activación de células T específicas.

- 15 Se ha reportado recientemente que las interacciones moleculares entre muchos de los receptores y ligandos implicados en esta interacción celular, incluyendo moléculas TCR y MHC, son inestables, es decir, de baja afinidad. Por ejemplo, se ha medido que la interacción monovalente molécula MHC-TCR tiene una constante de afinidad de $K_D = 10 \mu\text{M}$ con una constante de disociación menor de un minuto. La interacción molecular de CD28 y proteína B7 tiene una constante de afinidad del mismo nivel. En comparación, la estabilidad y afinidad de los complejos formados por interacciones de alta afinidad, por ejemplo, unión ligando hormonal-receptor (insulina/IR) y unión anticuerpo-antígeno, son significativamente mayores (constante de afinidad K_D en el intervalo de 0,1-10 nM).

- 20 La pluralidad de proteínas relacionadas con la activación de las células T, sin embargo, no sólo estabilizan el contacto celular entre APC y células T, sino que también contribuyen a una variedad de eventos de señalización requeridos para la activación de las células T. Son las acciones orquestadas de estos eventos de señalización las que determinan la activación de las células T. Por ejemplo, se ha mostrado que las células T citolíticas sin activar requieren al menos dos señales para la activación. La primera señal se proporciona mediante la ligación de moléculas MHC (expresadas en APC) a TCR en las células T. La segunda señal se proporciona mediante moléculas
25 co-estimuladoras, por ejemplo, de la familia de proteínas B7, que se unen al receptor CD28 en las células T.

Molécula MHC y presentación de antígeno: un punto de entrada al sistema inmune específico

- 30 Los genes localizados en el locus MHC humano (locus HLA) codifican un conjunto de proteínas de membrana altamente polimórficas que muestrean péptidos en compartimentos intracelulares y presentan dichos epítomos peptídicos en las superficies de células presentadoras de antígeno (APC) a células T escrutinadoras. El extenso polimorfismo genético del locus MHC es el fondo para la huella genética única del sistema inmune en individuos y define el repertorio de epítomos peptídicos antigénicos que la población humana es capaz de reconocer y a los que responder.

- 35 Existen dos subtipos de moléculas MHC, moléculas MHC Clase I y II. Estos subtipos corresponden a dos subconjuntos de linfocitos T: 1) células T citotóxicas CD8+, que habitualmente reconocen péptidos presentados por las moléculas MHC Clase I, y matan células T infectadas o mutadas, y 2) células T auxiliares CD4+, que habitualmente reconocen péptidos presentados por las moléculas MHC Clase II, y regulan las respuestas de otras células del sistema inmune. Las moléculas MHC Clase I consisten en una glicoproteína transmembrana con un PM de 43.000 (la cadena α) asociada no covalentemente con una proteína no glicosilada con un PM de 12.000 (la cadena ligera (β), también conocida como β_2 -microglobulina). Las moléculas MHC Clase II tienen una estructura global similar a las moléculas MHC Clase I aunque la distribución de dominios es diferente. La molécula MHC Clase II consiste en dos glicoproteínas transmembrana asociadas no covalentemente con un PM de aproximadamente 34.000 y 29.000. Las estructuras detalladas de las moléculas MHC Clase I y II se han resuelto a nivel de cristalografía de rayos X, por ejemplo, por Björkman et al. (ref. 8). La parte más interesante de la estructura de la molécula MHC es la parte "superior" que muestra un surco único de unión a péptido que consiste en dos hélices alfa que forman las paredes del surco y ocho láminas beta plegadas que forman el suelo del surco.
45

- Los péptidos son las estructuras diana esenciales en el reconocimiento de "no propio" por el sistema inmune adaptativo y, se podría decir, el grupo de moléculas MHC comprende un punto de entrada al sistema inmune, siendo así un jugador principal en la determinación de la penetrancia y diseminación de las enfermedades humanas. Las moléculas MHC de otras especies de vertebrados superiores ejercen funciones biológicas idénticas a las de HLA en el ser humano.
50

- El locus MHC es extremadamente polimórfico, es decir, existen muchas versiones diferentes (alelos, alotipos) en la población, pero cada individuo sólo ha heredado dos de éstos (uno del padre y uno de la madre). También es poligénico, es decir, existen varios loci que codifican MHC en el genoma permitiendo la expresión simultánea de varios isotipos. De forma importante, la mayoría de los residuos polimórficos apuntan hacia el surco de unión a péptido afectando su tamaño, forma y funcionalidad como describen, por ejemplo, Matsumura et al (ref. 9). Las interacciones péptido-MHC son específicas, aunque amplias, permitiendo la unión de muchos péptidos no relacionados a cada alotipo de MHC. El polimorfismo dicta la especificidad de la unión a péptido y la consecuencia biológica de esto es que cada individuo en la población educa y da forma a un repertorio único de células T.
55

Se ha identificado una variedad de moléculas semejantes a moléculas MHC de Clase I relativamente invariante. Este grupo comprende CD1d, HLA E, HLA G, HLA H, HLA F, MIC A, MIC B, ULBP-1, ULBP-2, y ULBP-3. Estas moléculas no clásicas tienen una distribución tisular y funciones distintas de HLA A, B y C. Algunas de ellas sólo comprenden una proteína de cadena pesada, es decir, no se asocian con moléculas β_2m y péptidos. Como se ha descrito previamente, las respuestas inmunes se desarrollan a partir de una interacción orquestada de células procesadoras/presentadoras de antígeno y células efectoras.

Se han producido en bacterias así como células eucariotas, formas de monómero y solubles de moléculas MHC cognadas así como modificadas, por ejemplo, proteína de cadena única con péptido, cadenas pesada y ligera fusionadas en una construcción. Los avances recientes en la tecnología recombinante y métodos de plegamiento de proteínas *in vitro* han proporcionado protocolos eficientes para la producción a gran escala de moléculas MHC multiméricas, que se unen con alta avidéz a receptores de células T apropiados.

Células NK y moléculas MHC

Las células NK han permanecido misteriosas hasta recientemente. Estas células se definieron por su capacidad de lisar determinados tumores en ausencia de estimulación previa. Reportes recientes han mostrado, sin embargo, que la actividad de las células NK está regulada por varios ligandos incluyendo molécula MHC (ref. 5). Las células NK reconocen las moléculas MHC Clase I a través de receptores de superficie que proporcionan una señal inhibitoria. Así, las células NK pueden lisar células diana que han perdido la expresión de moléculas MHC. Es muy conocido que las células tumorales frecuentemente reducen o pierden su expresión de moléculas MHC debido presumiblemente a una presión selectiva de células T citotóxicas que reconocen antígenos (péptidos) asociados a tumores en el contexto de moléculas MHC. La capacidad de las células NK de discriminar entre células normales y tumorales se explica entonces por la "hipótesis de pérdida de lo propio" por Ljunggren et al. (ref. 6). Sin embargo, las células NK no están equipadas simplemente con receptores que reconocen un amplio espectro de moléculas MHC. La complejidad de los receptores NK también se refleja por la expresión de diferentes isoformas, algunas de las cuales son activadoras mientras otras son inhibitorias. De forma interesante, el 5-10% de las células T (alfa beta) también expresan diferentes receptores NK tales como KIR, ILT o CD94/NKG2, que pertenecen a la superfamilia de receptores inhibitorios. Dichos receptores pueden servir para elevar el umbral de activación para respuestas inmunes celulares (ref. 7).

Los equilibrios entre receptores estimuladores e inhibitorios controla presumiblemente la activación de las células T y NK. Algunos de los diferentes receptores NK expresados en células NK y T reconocen una especificidad más amplia de moléculas MHC Clase I, mientras otros reconocen determinantes alélicos expresados más raramente. Así, las moléculas MHC pueden estar implicadas tanto en la estimulación como inhibición de respuestas inmunes específicas.

El receptor de las células T

El receptor de las células T, un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, consiste en dos glicoproteínas transmembrana asociadas no covalentemente (cadenas " α " y " β ") con un PM de aproximadamente 30.000; comprendiendo cada una dos dominios extracelulares. Las dos cadenas forman un dímero, que se asocia con un complejo proteico mayor, CD3. Las estructuras detalladas de TCR en asociación con moléculas MHC Clase I se ha resuelto a nivel de cristalografía de rayos X. Las formas recombinantes de TCR solubles (que consisten en los dominios extracelulares) se han producido en bacterias y células eucariotas.

La interacción específica de ligandos de TCR específico, es decir, complejos péptido inmunogénico/HLA y receptores de células T específicos resulta en la formación inducida por ligando de un señalosoma compuesto por el complejo TCR/CD3 y su interacción con conjuntos intracelulares de tirosina quinasas (Ick, Fyn, Syk, Zap-70) y adaptadores (LAT, TRIM y Grp2) (ref. 4). Como se ha descrito anteriormente, los TCR se expresan clonalmente y sólo complejos MHC específicos de péptido apropiados pueden incitar una respuesta inmune.

Para resumir, se podría decir que los clones de células T individuales "prueban" fragmentos mínimos del mundo exterior e interior a través de la interacción de receptores de células T específicos y sus ligandos naturales; los péptidos en el contexto de moléculas HLA. Las células T requieren, sin embargo, ligandos adicionales (se podría decir ligandos compuestos) que en una acción concertada con moléculas HLA- proporcionan señales apropiadas para la activación de las células T.

Moléculas co-estimuladoras

Las respuestas inmunes adaptativas requieren dos señales para la activación inicial: una señal proporcionada a través de la unión de péptido-MHC en la célula presentadora de antígeno (APC) al receptor de las células T (TCR), y una segunda señal independiente de antígeno denominada co-estimulación. CD28 es un receptor de membrana en las células T que proporciona función co-estimuladora cuando las células T se encuentran a APC que expresan ligandos CD28, B7-1 (CD80) de B7-2 (CD86). Las funciones de CD28 son predominantemente influir en señales iniciadas a través de TCR, lo que resulta en cambios cualitativos y cuantitativos en la cascada de eventos que dan lugar a la proliferación, producción de citoquinas, y supervivencia celular. El desencadenamiento de células T sin estimular sin la señal co-estimuladora puede convertir las células T en funcionalmente no respondedoras (anergia,

apoptosis). CD28 induce una mayor proliferación de células T CD4+ comparado con células T CD8+. Otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) CD28 tal como incluye co-estimulador inducible (ICOS) proporciona señales co-estimuladoras en células T CD4+ y CD8+ activadas para aumentar su proliferación.

5 Las respuestas de linfocitos están reguladas por señales inhibitoras así como activadoras. CTLA-4 y PD-1 median dichas señales inhibitoras. CTLA-4 tiene una mayor afinidad para los ligandos compartidos B7-1 y B7-2 comparado con CD28, y se regula al alza después de la unión TCR-CD28. PD-1 parece mediar una señal inhibitora, y se expresa ampliamente en tejidos derivados de hematopoyéticos y en células T activadas. La interleuquina-2 y señales co-estimuladoras son los dos factores más importantes requeridos para el mantenimiento de la división celular continua.

10 Aunque CD28 proporciona una señal co-estimuladora crítica en células T sin estimular, otras moléculas co-estimuladoras en la superfamilia del receptor de necrosis tumoral (TNFR), tales como 4-1BB (CD137), CD27 y OX40 (CD134), proporcionan señales co-estimuladoras en células T activadas para orientar la cualidad de la respuesta de las células T hacia la supervivencia celular o apoptosis.

15 Algunas células T efectoras CD8+ carecen de expresión de CD28. Sin embargo, estas células el homo-dímero NKG2D semejante a lectina, un receptor para las moléculas semejantes a MHC Clase I denominado MIC. NKG2D sirve como una molécula co-estimuladora para células T CD28-CD8+ y con el desencadenamiento combinado de complejos TCR/CD3 inducen IL-2 y la proliferación de células T. La expresión y función de NKG2D se regulan al alza selectivamente por la citoquina IL-15. NKG2D humano se expresa en células T gamma,delta, células T CD8+, células NK, y un pequeño subconjunto de células T CD4+. Las moléculas MIC A y MIC B inducidas por estrés se expresan en el epitelio intestinal así como en diversos tumores de origen epitelial. Las células NK son capaces de rechazar tumores que expresan moléculas MHC Clase I si el tumor expresa un ligando para NKG2D, es decir, MIC A o MIC B. Una familia de receptores (NKp46, NKp30, NKp44) denominados receptores de citotoxicidad natural (NCR) expresados en células NK están implicados en la lisis mediada por NK de varios tumores.

Citoquinas

25 Como se ha mencionado anteriormente, las citoquinas juegan un papel importante en la comunicación entre células. El grupo de citoquinas comprende

Interferones (IFN): Los interferones son tipos de citoquinas que se producen naturalmente en el cuerpo. Hay tres tipos principales de interferones; interferón-alfa, interferón-beta, e interferón-gamma. Los interferones estimulan las células NK, células T, y macrófagos, reforzando la función del sistema inmune.

30 Interleuquinas: Como los interferones, las interleuquinas son citoquinas que se producen naturalmente en el cuerpo y pueden prepararse en el laboratorio. Se han identificado muchas interleuquinas; la interleuquina-2 (IL-2) ha sido la más ampliamente estudiada en el tratamiento del cáncer. IL-2 estimula el crecimiento y actividad de muchas células inmunes, tales como linfocitos. Los factores estimuladores de colonias (CSF) (algunas veces denominados factores de crecimiento hematopoyéticos) habitualmente estimulan las células de la médula ósea para dividirse y desarrollarse en células sanguíneas blancas, plaquetas, y células sanguíneas rojas. La médula ósea es crítica para el sistema inmune del cuerpo porque es la fuente de todas las células sanguíneas.

Estrategias de terapia y vacuna para la manipulación de las respuestas inmunes

40 La terapia biológica (inmunoterapia, bioterapia, o terapia modificadora de la respuesta biológica) es un tipo relativamente nuevo de tratamiento y se basa en el conocimiento del mecanismo celular y molecular que subyace a la activación del sistema inmune humano. Por ejemplo, el sistema inmune puede reconocer la diferencia entre células sanas y células cancerosas en el cuerpo y funcionar para eliminar aquellas que se convierten en cancerosas. Las terapias biológicas usan el sistema inmune del cuerpo, bien directamente o indirectamente, para luchar contra el cáncer o para disminuir los efectos secundarios que pueden causar algunos tratamientos del cáncer. Un objetivo importante de dicha inmunoterapia es reforzar el poder de matar de las células del sistema inmune por la estimulación de células efectoras apropiadas, tales como células T.

50 Las "vacunas" del cáncer son una forma de terapia biológica. Las vacunas convencionales para enfermedades infecciosas, tales como sarampión, paperas, y tétanos, son efectivas porque exponen al sistema inmune a versiones debilitadas de la enfermedad. Esta exposición causa que el sistema inmune responda produciendo anticuerpos. Una vez el sistema inmune ha creado anticuerpos, algunas de las células inmunes activadas recuerdan la exposición. Por lo tanto, la próxima vez que el mismo antígeno entre en el cuerpo, el sistema inmune puede responder más fácilmente para destruirlo.

55 Para el tratamiento del cáncer, los investigadores están desarrollando vacunas que pueden estimular al sistema inmune para reconocer las células cancerosas. Estas vacunas pueden ayudar al cuerpo a rechazar tumores y prevenir que el cáncer recurra. A diferencia de las vacunas frente a enfermedades infecciosas, las vacunas del cáncer se diseñan para ser inyectadas después de que se ha diagnosticado la enfermedad, en lugar de antes de que se desarrolle. Por ejemplo, se ha mostrado que la inmunización con DC cargadas con péptidos apropiados de antígenos asociados con tumores (TAA) estimulan células T "específicas de tumor", que en algunos pacientes

previenen la progresión adicional de la enfermedad y eventualmente dan lugar a la regresión de la enfermedad. Esta estrategia se aprovecha de la "ruta profesional" de procesamiento/presentación de antígeno realizada por las DC. Por el contrario, la inyección de TAA tumorales solubles o moléculas MHC solubles que comprenden péptidos apropiados de TAA sólo ha demostrado un efecto limitado o ninguno, debido presumiblemente a la baja eficacia de la estimulación de antígeno por antígenos solubles. La baja afinidad así como la estimulación insuficiente de células T específicas puede explicar la baja protección obtenida por la inmunización con péptido/molécula MHC soluble. De hecho, la baja afinidad intrínseca de las interacciones ligando-receptor esenciales ha implicado una utilización limitada de proteínas recombinantes solubles para la estimulación de células T específicas.

La presente invención

10 Como es evidente a partir de lo anterior, las moléculas MHC juegan un papel muy importante, y así la detección de células que reconocen moléculas MHC tiene una gran importancia y valor. Asimismo, se han hecho varios intentos para manipular el sistema inmune de una manera controlable, eficiente y consistente. Sin embargo, el éxito ha sido limitado. Así, el descubrimiento de sustancias para inmunoterapia que realmente funcionen sería una etapa principal hacia delante para la lucha frente a varias enfermedades graves para las que actualmente no existe cura.

15 Por la presente invención, se proporcionan herramientas poderosas. La presente invención introduce determinados compuestos poli-ligando, que serán eficientes entre otros en el campo del diagnóstico y terapia.

La presente invención está relacionada con el proyecto principal de generar compuestos que comprenden moléculas MHC para detectar y analizar receptores en células que reconocen MHC tal como clones de células T específicas de epítipo u otras células efectoras inmunes competentes. En la presente memoria se muestra que las valencias incrementadas de compuestos de la invención producen sorprendentemente una mayor avidéz en comparación con complejos oligo-valentes (tetrámeros) conocidos de la técnica anterior. Esto permite un análisis cuantitativo incluso de poblaciones pequeñas de células, por ejemplo, por citometría de flujo.

20 Los tetrámeros mencionados anteriormente se conocen, por ejemplo, de US 5.635.363 por Altman et al. (ref. 10). En US 5.635.363, se describen complejos de unión multiméricos que comprenden dos o más moléculas MHC con péptidos unidos a una entidad multivalente. El número de moléculas MHC es preferiblemente cuatro, formando así un tetrámero. La entidad multivalente es preferiblemente estreptavidina o avidina.

El potencial y valor de la presente invención es obvio, ya que varios reportes han demostrado ausencia de correlación entre la reactividad de células T en la sangre periférica y el curso de las enfermedades neoplásicas (por ejemplo, ref. 11). Por ejemplo, el análisis de la actividad de las células T en tejidos tumorales así como tejidos linfáticos puede proporcionar un mejor conocimiento de la inmunidad hacia tumores sólidos.

La combinación de las bases de datos de genoma crecientes de secuencias proteicas primarias de seres humanos y parásitos con el conocimiento de cómo el sistema inmune maneja la información molecular proporcionada por ligandos apropiados dará lugar a estrategias nuevas y potentes para el desarrollo de vacunas curativas. Esto, a su vez, mejorará las posibilidades para manipulaciones inmunes dirigidas y eficientes frente a enfermedades causadas por la génesis tumoral o infección por agentes patógenos como virus y bacterias. VIH es un ejemplo importante. La capacidad para generar y ligar moléculas MHC recombinantes o una variedad de ligandos mixtos a moléculas vehiculares como se considera por la presente invención, permitirá una herramienta analítica nueva para monitorizar las respuestas inmunes y contribuir a una plataforma racional para nuevas aplicaciones de terapia y de "vacuna". Las composiciones terapéuticas ("vacunas") que estimulan la proliferación de células T específicas por la estimulación específica de péptido es de hecho una posibilidad en la presente invención. Así, el análisis cuantitativo y detección basada en ligando de células T específicas que proliferan por la estimulación específica de péptido debe realizarse simultáneamente a la monitorización de la respuesta generada. Los métodos efectivos para producir una variedad de moléculas del grupo de proteínas codificadas por HLA humano altamente polimórfica daría lugar a análisis avanzados de respuestas inmunes complejas, que pueden comprender una variedad de clones de células T específicos de epítipo peptídico. La citometría de flujo basada en alta avidéz y las estrategias de tinción de tejidos de la tecnología del estado de la técnica descritas en la presente memoria contribuirán significativamente al desarrollo de dichos análisis avanzados de respuestas de células T.

Las construcciones de moléculas MHC de la presente invención

Uno de los beneficios de las construcciones de moléculas MHC de la presente invención es claramente que las construcciones de moléculas MHC superan las bajas afinidades intrínsecas de los ligandos monoméricos y contra receptores. Debe indicarse, sin embargo, que dichas construcciones de moléculas MHC pueden tener una gran variedad de aplicaciones que incluyen tomar como diana receptores de alta afinidad (por ejemplo, receptores de péptidos hormonales para insulina) en células diana. Tomados conjuntamente la unión de poli-ligandos a células diana tiene usos prácticos, clínicos y científicos de interés comercial inmediato.

55 Así, la presente invención proporciona construcciones de moléculas MHC, que presentan sitios de unión multivalentes para células que reconocen MHC. Las construcciones de la presente invención tienen propiedades altamente ventajosas y son una herramienta importante con un amplio rango de usos valiosos.

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a construcciones de moléculas MHC que comprenden una molécula vehicular que tiene unida a ella una o más moléculas MHC, estando unidas dichas moléculas MHC a la molécula vehicular bien directamente o mediante una o más entidades de unión.

"Una o más" y como se usa en cualquier lugar en la presente memoria se pretende que incluya una y una pluralidad.

- 5 Esto se aplica entre otros a la molécula MHC y a la entidad de unión. La molécula vehicular puede tener así unida a ella una molécula MHC o una pluralidad de moléculas MHC, y/o una entidad de unión o una pluralidad de entidades de unión.

"Una pluralidad" tal y como se usa en cualquier lugar en la presente memoria debe interpretarse como dos o más.

Esto se aplica entre otros a la molécula MHC y a la entidad de unión.

- 10 Cuando una pluralidad de moléculas MHC está unida a la molécula vehicular, el número puede estar limitado sólo por la capacidad de la molécula vehicular o la entidad de unión, según sea el caso. El número de entidades de unión puede estar limitado sólo por la capacidad y naturaleza de la molécula vehicular.

- 15 Dependiendo del uso de las construcciones de moléculas MHC de la presente invención, la construcción como tal puede proporcionarse en forma soluble o no soluble seleccionando cuidadosamente la molécula vehicular. Tanto el formato soluble como no soluble presenta las propiedades ventajosas.

Tal y como se usa en cualquier lugar en la presente memoria, el término "un", "una" o "el" quiere decir uno o más, es decir, al menos uno.

"Construcción de moléculas MHC" y "construcciones MHC" pueden usarse indistintamente en la presente memoria.

- 20 Por el término "molécula MHC" tal y como se usa en cualquier lugar en la presente memoria se quiere decir dicha molécula, que es capaz de realizar al menos una de las funciones atribuidas a dicha molécula. El término incluye moléculas MHC tanto clásicas como no clásicas. El significado de "clásica" y "no clásica" en conexión con moléculas MHC es muy conocido para el experto en la técnica. Las moléculas MHC no clásicas son subgrupos de moléculas semejantes a MHC. Los términos "molécula MHC" y "MHC" se usan indistintamente en la presente memoria. Así, el término "molécula MHC" se pretende además que incluya moléculas MHC Clase I, moléculas MHC Clase II, así como moléculas semejantes a MHC (tanto Clase I como Clase II), incluyendo el subgrupo moléculas MHC no clásicas Clase I y Clase II.
- 25

- Una "molécula MHC Clase I" tal y como se usa en cualquier lugar en la presente memoria se define como una molécula que comprende 1-3 subunidades, incluyendo una cadena pesada, una cadena pesada combinada con una cadena ligera (β_2m), una cadena pesada combinada con una cadena ligera (β_2m) mediante un conector flexible, una cadena pesada combinada con un péptido, una cadena pesada combinada con un péptido mediante un conector flexible, un dímero cadena pesada/ β_2m combinado con un péptido, y un dímero cadena pesada/ β_2m combinado con un péptido mediante un conector flexible a la cadena pesada o ligera. La cadena de molécula MHC puede cambiarse por sustitución de un único aminoácido o cohortes de aminoácidos nativos o por insertos, o deleciones para aumentar o alterar las funciones atribuidas a dicha molécula. Como ejemplo, se ha mostrado que la sustitución de XX con YY en posición nn de β_2m humano aumenta la estabilidad bioquímica de los complejos de moléculas MHC Clase I y así puede dar lugar a una presentación de antígeno más eficiente de epítopos peptídicos subdominantes.
- 30
- 35

- Una "molécula MHC Clase II" tal y como se usa en cualquier lugar en la presente memoria se define como una molécula que comprende 2-3 subunidades incluyendo una cadena α y una cadena β (dímero α/β), un dímero α/β con un péptido, y un dímero α/β combinado con un péptido mediante un conector flexible a la cadena α o β , un dímero α/β combinado mediante una interacción por etiquetas de afinidad, por ejemplo, jun-fos, un dímero α/β combinado mediante una interacción por etiquetas de afinidad, por ejemplo, jun-fos y combinado adicionalmente con un péptido mediante un conector flexible a la cadena α o β . Las cadenas de molécula MHC pueden cambiarse por sustitución de un único aminoácido o cohortes de aminoácidos nativos o por insertos, o deleciones para aumentar o alterar las funciones atribuidas a dicha molécula.
- 40
- 45

Las moléculas semejantes a MHC Clase I (incluyendo moléculas MHC Clase I no clásicas) incluyen CD1d, HLA E, HLA G, HLA F, HLA H, MIC A, MIC B, ULBP-1, ULBP-2, Y ULBP-3.

Las moléculas semejantes a MHC Clase II (incluyendo moléculas MHC Clase II no clásicas) incluyen HLA DM, HLA DO, I-A, beta2 y I-E beta2.

- 50 Una "molécula MHC Clase I sin péptido" tal y como se usa en cualquier lugar en la presente memoria quiere decir una molécula MHC Clase I como se ha definido anteriormente sin péptido.

Una "molécula MHC Clase II sin péptido" tal y como se usa en cualquier lugar en la presente memoria quiere decir una molécula MHC Clase II como se ha definido anteriormente sin péptido.

Dichas moléculas MHC Clase I y II sin péptido también se denominan moléculas MHC Clase I y II "vacías".

La molécula MHC puede ser adecuadamente una molécula MHC de vertebrado tal como una molécula MHC de ser humano, ratón, rata, porcino, bovino o aviar. Dichas moléculas MHC de diferentes especies tienen diferentes nombres. Por ejemplo, en los seres humanos, las moléculas MHC se denominan HLA. El experto en la técnica conocerá fácilmente el nombre de las moléculas MHC de varias especies.

En general, el término "molécula MHC" se pretende que incluya alelos. Como ejemplo, en los seres humanos, por ejemplo, los alelos HLA A, HLA B, HLA C, HLA D, HLA E, HLA F, HLA G, HLA H, HLA DR, HLA DQ y HLA DP son interesantes, y en el sistema de ratón, los alelos H-2 son interesantes. Asimismo, en el sistema de rata los alelos RT-1, en el sistema porcino los alelos SLA, en el sistema bovino BoLA, en el sistema aviar, por ejemplo, los alelos B de pollo, son interesantes.

La definición de la construcción de moléculas MHC de la presente invención permite varias posibilidades valiosas respecto a las moléculas MHC. Así, los ejemplos de construcciones de moléculas MHC valiosas son tales

en la que al menos dos de las moléculas MHC son diferentes,

en la que las moléculas de MHC son iguales,

en la que al menos dos de los péptidos portados por las moléculas MHC son diferentes,

en la que los péptidos portados por las moléculas MHC son iguales,

en la que los péptidos portados por las moléculas MHC están químicamente modificados o sintetizados para contener aminoácidos no naturales, o para contener grupos hidrofílicos o hidrofóbicos,

en la que los péptidos portados por las moléculas MHC Clase I están unidos a la cadena pesada MHC Clase I por un conector flexible,

en la que los péptidos portados por las moléculas MHC Clase I están unidos a la cadena ligera (β_2m) MHC Clase I por un conector flexible,

en la que los péptidos están portados por moléculas MHC Clase I que comprenden cadena pesada MHC Clase I en asociación con una cadena ligera (β_2m) por un conector flexible,

en la que el péptido portado por las moléculas MHC Clase II están unidos a la cadena alfa por un conector flexible,

en la que el péptido portado por las moléculas MHC Clase II están unidos a la cadena β por un conector flexible,

en la que las moléculas MHC Clase I están mutadas,

en la que las moléculas MHC Clase II están mutadas.

La lista anterior no es exhaustiva de ninguna manera, sino que destaca varias posibilidades valiosas.

En particular, si los péptidos portados por una pluralidad de moléculas MHC son diferentes entre sí, esto puede usarse para detectar varios tipos de células que reconocen MHC simultáneamente. Esto puede conseguirse bien empleando una construcción de moléculas MHC con moléculas MHC rellenas con diferentes péptidos, o empleando varias construcciones de moléculas MHC, en las que cada construcción de moléculas MHC tiene moléculas MHC con el mismo tipo de péptido, por ejemplo, presentando una construcción de moléculas MHC un péptido, y presentando otra construcción de moléculas MHC otro péptido.

En una realización de las construcciones de moléculas MHC de la presente invención, la una o más moléculas MHC están unidas a la molécula vehicular directamente. En otra realización, la una o más moléculas MHC están unidas a la molécula vehicular mediante una o más entidades de unión.

Cuando las moléculas MHC están unidas mediante una o más entidades de unión, cada entidad de unión tiene adecuadamente unida a ella de 1 a 10, tal como de 1 a 8, de 1 a 6, de 1 a 4, de 1 a 3, ó 1 ó 2 moléculas MHC. Sin embargo, debe entenderse que el número posible de moléculas MHC depende de la entidad de unión en cuestión (es decir, de cuantas moléculas MHC puedan unirse). Así, eligiendo la entidad de unión cuidadosamente, puede ser posible unir más de 10 moléculas MHC a cada entidad de unión. Sin embargo, debe entenderse que este número puede ser el número medio de moléculas MHC unidas a cada entidad de unión. Así, el número de moléculas MHC puede estar distribuido uniformemente o no uniformemente en la entidad de unión ya que las construcciones de moléculas MHC se preparan y purifican lo más frecuentemente con una determinada distribución de peso deseada. Así, no es necesario que el número medio sea un número entero, sino que puede ser cualquiera entre dos números enteros (es decir, un número decimal), por ejemplo, 2,8, 4,7 ó 5,3, por mencionar unos pocos ejemplos no limitativos.

El número total de moléculas MHC de la construcción de moléculas MHC es en principio ilimitado. Así, el número total de moléculas MHC de la construcción puede ser adecuadamente al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 12, al menos 16, al menos 20, al menos 24, al menos 28, al menos 32, o al menos 64. En particular, el número total de moléculas MHC de la construcción puede estar en de 1 a 100, en de 1 a 95, en de 1 a 90, en de 1 a 85, en de 1 a 80, en de 1 a 75, en de 1 a 70, en de 1 a 65, en de 1 a 60, en de 1 a 55, en de 1 a 50, en de 1 a 45, en de 1 a 40, en de 1 a 35, en de 1 a 30, en de 1 a 25, en de 1 a 20, en de 1 a 15, en de 1 a 10, en de 1 a 5, en de 1 a 4, en de 1 a 3, ó 1 ó 2. Debe entenderse que el término "número total" se pretende que incluya moléculas MHC unidas a la molécula vehicular mediante una o más entidades de unión así como moléculas MHC unidas directamente a la molécula vehicular. Sin embargo, debe entenderse que el total de este número puede ser el número medio de moléculas MHC unidas. Así, el número de moléculas MHC puede estar distribuido uniformemente o no uniformemente entre una pluralidad de construcciones de moléculas MHC. Así, no es necesario que el número medio sea un número entero, sino que puede ser cualquier número entre dos números enteros (es decir, un número decimal), por ejemplo, 28,4, 44,5 ó 57,2, por mencionar unos pocos ejemplos no limitativos.

La entidad de unión es cualquiera que sea adecuada para la unión de las moléculas MHC, mientras da lugar a moléculas MHC capaces de unirse a células que reconocen MHC. Los ejemplos de entidades de unión adecuadas son estreptavidina (SA) y avidina y derivados de éstas, biotina, inmunoglobulinas, anticuerpos (monoclonal, policlonal, y recombinante), fragmentos de anticuerpo y derivados de éstos, dominio de cremallera de leucina de AP-1 (jun y fos), hexa-his (resto de quelato de metal), hexa-hat GST (glutación S-transferasa) afinidad de glutación, péptido de unión a calmodulina (CBP), Etiqueta Strep, Dominio de Unión de Celulosa, Proteína de Unión a Maltosa, Etiqueta S-Péptido, Etiqueta de Unión a Quitina, Epítomos Inmunoreactivos, Etiquetas de Epítipo, Etiqueta E2, Etiqueta de Epítipo HA, Epítipo Myc, Epítipo FLAG, Epítomos AU1 y AU5, Epítipo Glu-Glu, Epítipo KT3, Epítipo IRS, Epítipo Btag, Epítipo de proteína Quinasa C, Epítipo VSV, lecitinas que median la unión a una diversidad de compuestos, incluyendo carbohidratos, lípidos y proteínas, por ejemplo ConA (*Canavalia ensiformis*) o WGA (aglutinina de germen de trigo) y tetranectina o Proteína A o G (afinidad de anticuerpo). También están comprendidas las combinaciones de dichas entidades de unión. Los ejemplos no limitativos son estreptavidina-biotina y jun-fos. En particular, cuando la molécula MHC se etiqueta, la entidad de unión puede ser una "anti-etiqueta". Por "anti-etiqueta" se quiere decir un anticuerpo que se une a la etiqueta y cualquier otra molécula capaz de unirse a dicha etiqueta.

El número, densidad, y naturaleza de las entidades de unión puede variar para cada molécula vehicular. Debe entenderse que la entidad de unión puede estar unida a la molécula vehicular mediante un conector. Los conectores adecuados incluyen péptido de unión a calmodulina (CBP), 6xHIS, Proteína A, Proteína G, biotina, Avidina, Estreptavidina, etiqueta Strep, Dominio de Unión de Celulosa, Proteína de Unión a Maltosa, Etiqueta S-Péptido, Etiqueta de Unión a Quitina, Epítomos Inmunoreactivos, Etiquetas de Epítipo, proteínas etiquetadas con GST, Etiqueta E2, Etiqueta de Epítipo HA, Epítipo Myc, Epítipo FLAG, Epítomos AU1 y AU5, Epítipo Glu-Glu, Epítipo KT3, Epítipo IRS, Epítipo Btag, Epítipo de proteína Quinasa C, Epítipo VSV.

La una o más moléculas MHC pueden estar unidas adecuadamente a la entidad de unión por etiquetas. Los ejemplos de etiquetas se proporcionan anteriormente bajo la definición de entidades de unión adecuadas. Así, las moléculas MHC que se etiquetan recombinantemente o se etiquetan químicamente se unen específicamente a la entidad de unión debido a alta afinidad. Las etiquetas recombinantes de moléculas MHC permiten además sitios de unión regio-específicos en las construcciones.

Las etiquetas pueden estar localizadas en cualquier parte de la molécula MHC, pero actualmente se cree que las etiquetas deben estar localizadas preferiblemente lejos de la parte de unión a célula de la molécula MHC.

Como ejemplo, una molécula MHC etiquetada podría ser un molécula MHC de fusión recombinante que consiste en molécula de cadena pesada MHC Clase I y una secuencia peptídica diana C-terminal para mono-biotinilación enzimática. La localización C-terminal de la etiqueta de afinidad permite una exposición óptima de la parte de unión a célula N-terminal de la molécula MHC. Actualmente se cree que las secuencias diana para biotinilación también pueden estar localizadas en las moléculas β_2m . La proteína MHC químicamente biotinilada se une a una entidad de unión de estreptavidina. La molécula MHC biotinilada se une a estreptavidina con alta afinidad. La proporción de moléculas MHC por estreptavidina es teóricamente 4:1 debido a cuatro sitios de unión de biotina en los complejos de estreptavidina.

En muchas aplicaciones, será ventajoso que la construcción de moléculas MHC comprenda además una o más moléculas biológicamente activas. Por el término "biológicamente activa" se quiere decir que el compuesto puede afectar las características de unión o los efectos de la construcción de moléculas MHC. Respecto a los términos "una o más", "una pluralidad", "un", "una", y "el", se hace referencia a las definiciones anteriores. Así, la construcción de moléculas MHC puede comprender varias moléculas biológicamente activas que pueden ser iguales o diferentes.

Dichas moléculas biológicamente activas pueden seleccionarse en particular de proteínas, moléculas co-estimuladoras, moléculas que modulan la célula, receptores, moléculas auxiliares, moléculas de adhesión, ligandos naturales, y moléculas tóxicas, así como anticuerpos y moléculas de unión recombinantes a cualquiera de los anteriores, y combinaciones de éstas.

"Moléculas de unión recombinantes" se pretende que signifique moléculas tales como fragmento peptídico preparadas por tecnología recombinante, y que tienen la capacidad de mimetizar la actividad (por ejemplo, regulación al alza o regulación a la baja) de las moléculas naturales, o de inhibir o bloquear la actividad de las moléculas naturales.

- 5 La molécula biológicamente activa puede unirse adecuadamente a la molécula vehicular bien directamente o mediante una o más entidades de unión.

En particular, la molécula biológicamente activa puede seleccionarse de

proteínas tales como proteínas semejantes a MHC Clase I como MIC A, MIC B, CD1d, HLA E, HLA F, HLA G, HLA H, ULBP-1, ULBP-2, y ULBP-3,

- 10 moléculas co-estimuladoras tales como CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD9, CD27, CD28, CD30, CD69, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD147, CDw150 (SLAM), CD152 (CTLA-4), CD153 (CD30L), CD40L (CD154), NKG2D, ICOS, HVEM, HLA Clase II, PD-1, Fas (CD95), FasL expresado en células T y/o NK, CD40, CD48, CD58, CD70, CD72, B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), B7RP-1, B7-H3, PD-L1, PD-L2, CD134L, CD137L, ICOSL, LIGHT expresado en APC y/o células tumorales,

- 15 moléculas que modulan células tales como CD16, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80, 2B4, KIR, LIR, CD94/NKG2A, CD94/NKG2C expresado en células NK, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, CSF (factores estimuladores de colonias), vitamina D3, toxinas IL-2, ciclosporina, FK-506, rapamicina, TGF-beta, clotrimazol, nitrendipina, y caribdotoxina,

- 20 moléculas auxiliares tales como LFA-1, CD11a/18, CD54 (ICAM-1), CD106 (VCAM), y CD49a,b,c,d,e,f/CD29 (VLA-4),

moléculas de adhesión tales como ICAM-1, ICAM-2, GlyCAM-1, CD34, anti-LFA-1, anti-CD44, anti-beta7, quimioquinas, CXCR4, CCR5, anti-selectina L, anti-selectina E, y anti-selectina P,

- 25 moléculas tóxicas seleccionadas de toxinas, enzimas, anticuerpos, radioisótopos, sustancias quimioluminiscentes, sustancias bioluminiscentes, polímeros, partículas metálicas, y haptenos, tales como ciclofosfamida, metotrexato, Azatioprina, mizoribina, 15-desoxuspergualina, neomicina, estaurosporina, genesteína, herbimicina A, exotoxina A de Pseudomonas, saporina, Rituxán, Ricina, gemtuzumab ozogamicina, toxina Shiga, metales pesados como mercuriales inorgánicos y orgánicos, y FN18-CRM9, radioisótopos tales como isótopos incorporados de yodo, cobalto, selenio, tritio, y fósforo, y haptenos tales como DNP, y digoxigenina,

- 30 y combinaciones de cualquiera de los anteriores, así como anticuerpos (monoclonal, policlonal, y recombinante) frente a los anteriores, según sea relevante. También pueden usarse derivados de anticuerpos o fragmentos de éstos.

Con el fin de permitir una detección fácil de la unión de la construcción de moléculas MHC a células que reconocen MHC, la construcción puede estar marcada. Así, en otro aspecto, la presente invención se refiere a una construcción de moléculas MHC como se ha definido anteriormente que comprende además uno o más compuestos marcadores. La definición de los términos "uno o más", "una pluralidad", "un", "una", y "el" proporcionada anteriormente también se aplica aquí. Una pluralidad de compuestos marcadores debe interpretarse en cualquier lugar como dos o más compuestos marcadores que pueden ser iguales o diferentes.

En particular,

uno o más compuestos marcadores pueden unirse a la molécula vehicular, o

- 40 uno o más compuestos marcadores pueden unirse a una o más de las entidades de unión, o

uno o más compuestos marcadores pueden unirse a una o más de las moléculas MHC, o

uno o más compuestos marcadores pueden unirse a la molécula vehicular y/o una o más de las entidades de unión y/o una o más de las moléculas MHC, o

uno o más compuestos marcadores pueden unirse al péptido portado por la molécula MHC.

- 45 En algunas aplicaciones, puede ser ventajoso aplicar diferentes construcciones de moléculas MHC, bien como una combinación o en etapas individuales. Dichas diferentes construcciones de moléculas MHC pueden marcarse de forma diferente (es decir, marcando con diferentes compuestos marcadores) lo que permite la visualización de diferentes células que reconocen MHC diana. Así, si están presentes varias construcciones de moléculas MHC diferentes con diferentes compuestos marcadores, es posible identificar simultáneamente más de un receptor específico, si cada una de las construcciones de moléculas MHC presenta un péptido diferente.

- 50

El compuesto marcador es preferiblemente uno que es directamente o indirectamente detectable.

- El compuesto marcador puede ser cualquier compuesto marcador adecuado para detección directamente o indirectamente. Por el término, "directamente" se quiere decir que el compuesto marcador puede detectarse per ser sin la necesidad de un compuesto secundario, es decir, es un compuesto marcador "primario". Por el término "indirectamente" se quiere decir que el compuesto marcador puede detectarse usando uno o más compuestos "secundarios", es decir, la detección se realiza por la detección de la unión del o de los compuestos secundarios al compuesto primario.
- El compuesto marcador puede unirse adicionalmente mediante un conector adecuado. Los conectores adecuados para la unión a compuestos marcadores serán fácilmente conocidos por el experto en la técnica.
- Los ejemplos de dichos compuestos marcadores adecuados son marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, radioisótopos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, polímeros, partículas metálicas, haptenos, anticuerpos, y agentes de tinción.
- El compuesto marcador puede seleccionarse adecuadamente
- de marcadores fluorescentes tales como 5- (y 6)-carboxifluoresceína, 5- ó 6-carboxifluoresceína, ácido 6-(fluorescein)-5-(y 6)-carboxamido hexanoico, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, tetrametilrodamina, y agentes de tinción tales como Cy2, Cy3, y Cy5, cumarina sustituida opcionalmente incluyendo AMCA, PerCP, ficobiliproteínas incluyendo R-ficoeritrina (RPE) y aloficoeritrina (APC), Rojo Texas, Rojo Princheston, proteína verde fluorescente (GFP) y análogos de ésta, y conjugados de R-ficoeritrina y aloficoeritrina y, por ejemplo, Cy5 o Rojo Texas, y marcadores fluorescentes inorgánicos basados en nanocristales semiconductores (como nanocristales quantum dot y Qdot™), y marcadores fluorescentes de tiempo resuelto basados en lantánidos como Eu3+ y Sm3+,
- de haptenos tales como DNP, biotina, y digoxigenina,
- de marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (GAL), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, beta-N-acetil-glucosaminidasa, β-glucuronidasa, invertasa, Xantina Oxidasa, luciferasa de luciérnaga y glucosa oxidasa (GO),
- de marcadores luminiscentes tales como luminol, isoluminol, ésteres de acridinio, 1,2-dioxetanos y piridopiridazinas, y
- de marcadores radiactivos tales como isótopos incorporados de yodo, cobalto, selenio, tritio, y fósforo.
- Los marcadores radiactivos pueden ser interesantes en particular en conexión con el marcaje de los péptidos portados por las moléculas MHC.
- Como se ha definido anteriormente, las construcciones de moléculas MHC de la invención comprenden una molécula vehicular. La molécula vehicular puede ser una molécula vehicular soluble o una molécula vehicular no soluble. La molécula vehicular puede ser cualquiera tal que permita la unión de las moléculas MHC, las entidades de unión, y/o los compuestos biológicamente activos, mientras proporciona las propiedades ventajosas de la construcción. Los ejemplos de moléculas vehiculares adecuadas son
- polisacáridos incluyendo dextranos, carboxi metil dextrano, dextrano polialdehído, carboximetil dextran lactona, y ciclodextrinas,
- pululanos, esquizofilano, escleroglucano, xantano, gellan, O-etilamino guaran, quitinas y quitosanos incluyendo 6-O-carboximetil quitina y N-carboximetil quitosán,
- celulósicos derivatizados incluyendo carboximetil celulosa, carboximetil hidroxietil celulosa, hidroxietil celulosa, 6-amino-6-desoxi celulosa y O-etil-amina celulosa,
- almidón hidroxilado, hidroxipropil almidón, hidroxietil almidón, carragenanos, alginatos, y agarosa,
- polisacáridos sintéticos incluyendo ficol y ficol carboximetilado,
- polímeros de vinilo incluyendo poli(ácido acrílico), poli(acrilamidas), poli(ésteres acrílicos), poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido maleico), poli(anhídrido maleico), poli(acrilamida), poli(etil-co-vinil acetato), poli(ácido metacrílico), poli(vinil alcohol), poli(vinil alcohol-co-vinil cloroacetato), poli(vinil alcohol) aminado, y polímeros co bloque de éstos,
- poli etilen glicol (PEG) o polipropilen glicol o poli(óxido de etileno-co-óxidos de propileno) que contienen núcleos poliméricos incluyendo dendrímeros lineales, en forma de peine o StarBurst™,
- poliaminoácidos incluyendo polilisinias, ácido poliglutámico, poliuretanos, poli(etilen iminas), pluriol,
- proteínas incluyendo albúminas, inmunoglobulinas, y proteínas semejantes a virus (VLP), y
- polinucleótidos, ADN, PNA, LNA, oligonucleótidos y construcciones de dendrímeros de oligonucleótidos.

También se incluyen en esta definición de la molécula vehicular formas mixtas, es decir, una molécula vehicular compuesta por uno o más de los ejemplos anteriores.

La elección de molécula vehicular depende entre otros de la aplicación de la construcción de moléculas MHC. Por supuesto, pueden variarse varios parámetros en los ejemplos proporcionados anteriormente de moléculas vehiculares, incluyendo la longitud y ramificación. Además las moléculas vehiculares pueden portar varios sustituyentes, incluyendo aquellos que puedan ser protegidos y/o activados, permitiendo una derivatización adicional.

Debe entenderse que la construcción de moléculas MHC de la invención puede comprender además uno o más sustituyentes adicionales. La definición de los términos "uno o más", "una pluralidad", "un" "una", y "el" también se aplica aquí. Dichas moléculas biológicamente activas pueden unirse a la construcción con el fin de afectar las características de las construcciones, por ejemplo, respecto a las propiedades de unión, efectos, especificidades de la molécula MHC, solubilidad, estabilidad, o detectabilidad. Por ejemplo, podría proporcionarse un espaciamiento entre las moléculas MHC, podría insertarse uno o ambos cromóforos de una pareja donante/aceptor de Transferencia de Energía Resonante de Fluorescencia (FRET), podrían unirse grupos funcionales, o podrían unirse grupos que tienen una actividad biológica.

La construcción de moléculas MHC de la invención se proporciona preferiblemente en forma soluble. Por "forma soluble" se quiere decir que la construcción es soluble en un disolvente adecuado ("medio de solubilización"). Sin embargo, la construcción de moléculas MHC también puede proporcionarse en forma no soluble, por ejemplo, forma dispersable, en un disolvente adecuado. Por "dispersable" se quiere decir que la construcción de moléculas MHC está dispersada, pero solubilizada, en el disolvente.

Los ejemplos de disolventes adecuados son agua y varios tampones tales como acetato, sulfato de amonio, cloruro de sodio, CAPS, CHES, imidazol, PIPES, TAPS, TES, trietanolamina, MOPS, MES, HEPES, PBS, carbonato, TRIS, tampones que contienen borato, así como mezclas de éstos.

Otros disolventes adecuados incluyen mezclas acuosas que contienen etilen glicol, propilen glicol, NMP, DMSO, o DMF.

El proporcionar la construcción de moléculas MHC en un medio de solubilización hace que el manejo y almacenamiento sea fácil. Además, el proporcionar la construcción de moléculas MHC en un medio de solubilización facilita la aplicación de las construcciones de moléculas MHC ya que las construcciones pueden prepararse en un formato "listo para usar" para muchas aplicaciones. También, cuando se aplica en terapia, puede ser ventajoso que la construcción de moléculas MHC sea fácilmente soluble en el fluido corporal, o esté ya solubilizada antes de la administración.

En varias aplicaciones, puede ser ventajoso inmovilizar la construcción de moléculas MHC en un soporte sólido o semi-sólido. Dicho soporte puede ser cualquiera que sea adecuado para la inmovilización, separación, etc. Los ejemplos no limitativos incluyen partículas, lechos, partículas biodegradables, láminas, geles, filtros, membranas (por ejemplo, membranas de nilón), fibras, capilares, agujas, tiras de microtitulación, tubos, placas o pocillos, peines, puntas de pipeta, micro matrices, chips, portaobjetos, o de hecho cualquier material de superficie sólida. El soporte sólido o semi-sólido puede marcarse, si se desea. El soporte también puede tener propiedades de dispersión o tamaños, que permiten la discriminación entre soportes de la misma naturaleza, por ejemplo, partículas de diferentes tamaños o propiedades de dispersión, color o intensidades.

Convenientemente, el soporte puede ser de vidrio, sílice, látex, plástico o cualquier material polimérico. El soporte puede ser también de un material biodegradable.

Hablando en general, la naturaleza del soporte no es crítica y puede usarse una variedad de materiales. La superficie del soporte puede ser hidrofóbica o hidrofílica. Los materiales preferidos son los que presentan una gran área superficial para la unión de las construcciones de moléculas MHC. Dichos soportes pueden ser por ejemplo porosos o particulados, por ejemplo, partículas, lechos, fibras, redes, sínteres o tamices. Los materiales particulados como partículas y lechos se prefieren generalmente debido a su mayor capacidad de unión. Particularmente, pueden ser interesantes los lechos y partículas poliméricos.

Convenientemente, un soporte particulado (por ejemplo, lechos o partículas) puede ser sustancialmente esférico. El tamaño del soporte particulado no es crítico, pero puede tener por ejemplo un diámetro de al menos 1 μm y preferiblemente al menos 2 μm , y tener un diámetro máximo de preferiblemente no más de 10 μm y más preferiblemente no más de 6 μm . Por ejemplo, los soportes particulados que tienen diámetros de 2,8 μm y 4,5 μm funcionarán bien.

Un ejemplo de un soporte particulado es partículas monodispersas, es decir, las que son sustancialmente uniformes en tamaño (por ejemplo, tamaño que tiene una desviación estándar de diámetro de menos de 5%). Éstas tienen la ventaja de que proporcionan una reproducibilidad muy uniforme de reacción. Son especialmente adecuadas las partículas monodispersas, por ejemplo, hechas de material polimérico, producidas por la técnica descrita en US 4.336.173 (ref. 25).

También pueden ser aplicables los lechos poliméricos no magnéticos. Éstos están disponibles en un amplio rango de fabricantes, por ejemplo, Dynal Particles AS, Qiagen, Amersham Biosciences, Serotec, Seradyne, Merck, Nippon Paint, Chemagen, Promega, Prolabo, Polysciences, Agowa, y Bangs Laboratories.

5 Otro ejemplo de un soporte adecuado es lechos o partículas magnéticas. El término "magnético" tal y como se usa en cualquier lugar en la presente memoria se pretende que signifique que el soporte es capaz de tener un momento magnético impartido a él cuando se pone en un campo magnético, y así es desplazable bajo la acción de ese campo magnético. En otras palabras, un soporte que comprende lechos o partículas magnéticas puede retirarse fácilmente por agregación magnética, lo que proporciona una manera rápida, simple y eficiente de separar los lechos o partículas de una disolución. Los lechos y partículas magnéticos pueden ser adecuadamente paramagnéticos o
10 superparamagnéticos. Los lechos y partículas superparamagnéticos se describen, por ejemplo, en EP 0 106 873 (Sintef, ref. 26). Los lechos y partículas magnéticos están disponibles en varios fabricantes, por ejemplo, Dynal Biotech ASA (Oslo, Noruega, previamente Dynal AS, por ejemplo, Dynabeads®).

El soporte puede tener adecuadamente una superficie funcionalizada. Los diferentes tipos de funcionalización incluyen hacer que la superficie del soporte esté cargada positivamente o negativamente, o hidrofílica o hidrofóbica.
15 Esto se aplica en particular a lechos y partículas. Varios métodos se describen, por lo tanto, por ejemplo, en US 4.336.173 (ref. 25), US 4.459.378 (ref. 27) y US 4.654.267 (ref. 28).

Las construcciones de moléculas MHC de la presente invención pueden estar unidas (inmovilizadas) al soporte sólido o semi-sólido por cualquier método conocido en la técnica para la unión (o inmovilización) a soportes. En particular, las construcciones de moléculas MHC pueden inmovilizarse al soporte mediante conectores, espaciadores o anticuerpos, o cualquier combinación de éstos. Los ejemplos de conectores adecuados incluyen péptido de unión a calmodulina (CBP), 6xHIS, Proteína A, Proteína G, biotina, Avidina, Estreptavidina, etiqueta Strep, Dominio de Unión de Celulosa, Proteína de Unión a Maltosa, Etiqueta S-Péptido, Etiqueta de Unión a Quitina, Epítomos Inmunoreactivos, Etiquetas de Epítipo, proteínas etiquetadas con GST, Etiqueta E2, Etiqueta de Epítipo HA, Epítipo Myc, Epítipo FLAG, Epítomos AU1 y AU5, Epítipo Glu-Glu, Epítipo KT3, Epítipo IRS, Epítipo Btag, Epítipo de proteína Quinasa C, Epítipo VSV, "entrecruzadores de longitud cero" tales como hidrocloreuro de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDAC), entrecruzadores homobifuncionales tales como dialdehído glutárico, suberato de disuccinimidilo (DSS), dihidrocloreuro de adipimidato de dimetilo (DMA), divinilfulfona (DVS), o bismaleimidoheptano, y entrecruzadores heterobifuncionales tales como hidrocloreuro de 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxil hidrazida (M2C2H), succinimidil-4-(N-maleimidometil) (SMCC), propionato de N-(succinimidil)-3-(2-piridiltio) (SPDP), y N-(gamma-maleimidobutiriloxi)succinimida (GMBS). Los ejemplos de espaciadores adecuados incluyen moléculas multi-funcionales tales como diamino alcanos, dicarboxilos y dihidroxilos. Los espaciadores pueden incluir adicionalmente funcionalidades tales como, por ejemplo, éteres, amidas, y aminas. Los ejemplos de anticuerpos adecuados (policlonal, monoclonal, recombinante) incluyen anticuerpos dirigidos frente a la molécula vehicular y anticuerpos frente a la entidad de unión. Debe entenderse que
20 las construcciones de moléculas MHC pueden estar unidas covalentemente o reversiblemente. Por "reversiblemente" se quiere decir que la unión puede revertirse de manera que las construcciones de moléculas MHC pueden liberarse del soporte. Los ejemplos de conectores reversibles posibles (por ejemplo, moléculas que tienen una secuencia de aminoácidos insertada que comprende un péptido elastomérico) se describen en WO 99/11661 (ref. 29).

40 Como ejemplo, si la molécula vehicular es una molécula de dextrano, la construcción de moléculas MHC puede inmovilizarse usando anticuerpos anti-dextrano. Como ejemplo, podría unirse un PNA a la construcción de moléculas MHC, y podría usarse un anticuerpo anti-PNA para la inmovilización.

Debe entenderse que pueden aplicarse al mismo tiempo varios o sólo un tipo de soporte. Asimismo, un soporte puede tener inmovilizado en él una o más construcciones de moléculas MHC. Respecto a las definiciones de "uno o más", "una pluralidad", "un", "una", y "el", véase anteriormente. Las construcciones de moléculas MHC inmovilizadas en el soporte pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, un tipo de construcción de moléculas MHC puede inmovilizarse en un tipo de soporte, y otro tipo de construcción de moléculas MHC en otro tipo de soporte. En principio, el número de diferentes construcciones de moléculas MHC es ilimitado.

Los usos en los que las construcciones de moléculas MHC de la invención pueden proporcionarse adecuadamente en forma solubilizada incluyen radioinmunoensayo (RIA), ensayo de ligando radiactivo unido a célula, citometría de flujo y ELISA. Dichos ensayos son ya conocidos para el experto en la técnica como lo son los procedimientos, mediante los que éstos se llevan a cabo.

Los usos en los que las construcciones de moléculas MHC de la invención pueden proporcionarse adecuadamente inmovilizadas en un soporte sólido o semi-sólido incluyen citometría de flujo, técnicas de separación inmunomagnéticas, estimulación ex vivo de células cultivadas, técnicas de agregación, dispositivos de flujo lateral, ELISA; RIA y ensayos de radioligando unido a célula.
55

Así, la presente invención se refiere en particular a construcciones de moléculas MHC como se han definido anteriormente para uso en métodos de citometría de flujo, métodos histoquímicos, y métodos citoquímicos. De

acuerdo con esto, las construcciones de moléculas MHC de la invención son adecuadas como sistemas de detección.

Métodos que emplean las construcciones de moléculas MHC de la invención

5 Las construcciones de moléculas MHC de la invención son una herramienta poderosa en un amplio rango de métodos in vitro o ex vivo.

Así, la presente invención se refiere a métodos para detectar la presencia de células que reconocen MHC en una muestra que comprende las etapas de

(a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC,

(b) poner en contacto la muestra con una construcción de moléculas MHC como se ha definido anteriormente, y

10 (c) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, unión que indica la presencia de células que reconocen MHC.

Dichos métodos son una herramienta poderosa en el diagnóstico de varias enfermedades. El establecimiento de un diagnóstico es importante de varias maneras. Un diagnóstico proporciona información acerca de la enfermedad, así se puede ofrecer al paciente un régimen de tratamiento adecuado. También, el establecimiento de un diagnóstico más específico puede proporcionar información importante acerca de un subtipo de una enfermedad para la que será beneficioso un tratamiento particular (es decir, varios subtipos de enfermedades pueden implicar la presentación de diferentes péptidos que son reconocidos por células que reconocen MHC, y así el tratamiento puede dirigirse efectivamente frente a un subtipo particular). De esta manera, también puede ser posible obtener información acerca de células aberrantes, que surgen a través del progreso de la enfermedad o afección, o para investigar si se afecta y cómo la especificidad de las células T. La unión de la construcción de moléculas MHC hace posible estas opciones, ya que la unión es indicativa de la presencia de las células que reconocen MHC en la muestra, y de acuerdo con esto la presencia de moléculas MHC que presentan el péptido.

La presente invención también se refiere a métodos para monitorizar células que reconocen MHC que comprenden las etapas de

25 (a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC,

(b) poner en contacto la muestra con una construcción de moléculas MHC como se ha definido anteriormente, y

(c) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, monitorizando de esta manera las células que reconocen MHC.

30 Dichos métodos son una herramienta poderosa en la monitorización del progreso de una enfermedad, por ejemplo, para seguir de cerca el efecto de un tratamiento. El método puede usarse entre otros para gestionar o controlar la enfermedad de una manera mejor, para asegurar que el paciente recibe el régimen de tratamiento óptimo, para ajustar el tratamiento, para confirmar la remisión o recurrencia, y para asegurar que el paciente no se trata con un medicamento que no cura o alivia la enfermedad. De esta manera, también puede ser posible monitorizar células aberrantes, que surgen a través del progreso de la enfermedad o afección, o para investigar si se afecta y cómo la especificidad de las células T durante el tratamiento. La unión de la construcción de moléculas MHC hace posible estas opciones, ya que la unión es indicativa de la presencia de las células que reconocen MHC en la muestra, y de acuerdo con esto la presencia de moléculas MHC que presentan el péptido.

La presente invención también se refiere a métodos para establecer un pronóstico de una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de

40 (a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC,

(b) poner en contacto la muestra con una construcción de moléculas MHC como se ha definido anteriormente, y

(c) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, estableciendo de esta manera un pronóstico de una enfermedad que implica células que reconocen MHC.

45 Dichos métodos son una herramienta valiosa con el fin de gestionar enfermedades, entre otros para asegurar que el paciente no se trata sin efecto, para asegurar que la enfermedad se trata de la manera óptima, y para predecir las posibilidades de supervivencia o cura. De esta manera, también puede ser posible obtener información acerca de células aberrantes, que surgen a través del progreso de la enfermedad o afección, o para investigar si se afecta y cómo la especificidad de las células T, siendo capaces de esta manera de establecer un pronóstico. La unión de la construcción de moléculas MHC hace posible estas opciones, ya que la unión es indicativa de la presencia de las células que reconocen MHC en la muestra, y de acuerdo con esto la presencia de moléculas MHC que presentan el péptido.

50

La presente invención también se refiere a métodos para determinar el estado de una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC,
- (b) poner en contacto la muestra con una construcción de moléculas MHC como se ha definido anteriormente, y

5 (c) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, determinando de esta manera el estado de una enfermedad que implica células que reconocen MHC.

Dichos métodos son una herramienta valiosa para gestionar y controlar varias enfermedades. Una enfermedad podría, por ejemplo, cambiar de un estadio a otro, y así es importante ser capaz de determinar el estado de la enfermedad. De esta manera, también puede ser posible obtener información acerca de células aberrantes, que surgen a través del progreso de la enfermedad o afección, o para investigar si se afecta y cómo la especificidad de las células T, determinando de esta manera el estado de una enfermedad o afección. La unión de la construcción de moléculas MHC hace posible estas opciones, ya que la unión es indicativa de la presencia de las células que reconocen MHC en la muestra, y de acuerdo con esto la presencia de moléculas MHC que presentan el péptido.

10

La presente invención también se refiere a métodos para el diagnóstico de una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de

15

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC,
- (b) poner en contacto la muestra con una construcción de moléculas MHC como se ha definido anteriormente, y
- (c) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, diagnosticando de esta manera una enfermedad que implica células que reconocen MHC.

20 Dichos métodos de diagnóstico son una herramienta poderosa en el diagnóstico de varias enfermedades. El establecimiento de un diagnóstico es importante de varias maneras. Un diagnóstico proporciona información acerca de la enfermedad, así se puede ofrecer al paciente un régimen de tratamiento adecuado. También, el establecimiento de un diagnóstico más específico puede proporcionar información importante acerca de un subtipo de una enfermedad para la que será beneficioso un tratamiento particular (es decir, varios subtipos de enfermedades pueden implicar la presentación de diferentes péptidos que son reconocidos por células que reconocen MHC, y así el tratamiento puede dirigirse efectivamente frente a un subtipo particular). También puede obtenerse información valiosa acerca de células aberrantes, que surgen a través del progreso de la enfermedad o afección así como si se afecta y cómo la especificidad de las células T. La unión de la construcción de moléculas MHC hace posible estas opciones, ya que la unión es indicativa de la presencia de las células que reconocen MHC en la muestra, y de acuerdo con esto la presencia de moléculas MHC que presentan el péptido.

25

30

La presente invención también se refiere a métodos para correlacionar la morfología celular con la presencia de células que reconocen MHC en una muestra que comprende las etapas de

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC,
- (b) poner en contacto la muestra con una construcción de moléculas MHC como se ha definido anteriormente, y
- 35 (c) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, correlacionando de esta manera la unión de la construcción de moléculas MHC con la morfología celular.

Dichos métodos son especialmente valiosos aplicados en el campo de los métodos histoquímicos, ya que el patrón de unión y distribución de las construcciones de moléculas MHC puede observarse directamente. En dichos métodos, la muestra se trata con el fin de preservar la morfología de las células individuales de la muestra. La información obtenida es importante entre otros en procedimientos de diagnóstico ya que los sitios afectados pueden observarse directamente.

40

La presente invención también se refiere a métodos para determinar la eficacia de un medicamento frente a una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de

- (a) proporcionar una muestra de un sujeto que recibe tratamiento con un medicamento,
- 45 (b) poner en contacto la muestra con una construcción de moléculas MHC como se ha definido en la presente memoria, y
- (c) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, determinando de esta manera la eficacia del medicamento.

Dichos métodos son una herramienta valiosa de varias maneras, Los métodos pueden usarse para determinar si un tratamiento está combatiendo eficazmente la enfermedad. El método también puede proporcionar información acerca de células aberrantes, que surgen a través del progreso de la enfermedad o afección así como de si se

50

afecta y cómo la especificidad de las células T, proporcionando de esta manera información de la eficacia de un medicamento en cuestión. La unión de la construcción de moléculas MHC hace posible estas opciones, ya que la unión es indicativa de la presencia de las células que reconocen MHC en la muestra, y de acuerdo con esto la presencia de moléculas MHC que presentan el péptido.

5 La presente invención también se refiere a métodos para manipular poblaciones de células que reconocen MHC que comprende las etapas de

(a) proporcionar una muestra que comprende células que reconocen MHC,

(b) poner en contacto la muestra con una construcción de moléculas MHC inmovilizada en un soporte sólido como se ha definido anteriormente,

10 (c) aislar las células que reconocen MHC relevantes, y

(d) expandir dichas células hasta un número clínicamente relevante, con o sin manipulación adicional.

Dichos métodos ex vivo son una herramienta poderosa para generar poblaciones de células T efectoras humanas específicas de antígeno, de vida larga, que, cuando se re-introducen en el sujeto, permiten matar las células diana y tiene un gran potencial para uso en aplicaciones de inmunoterapia frente a varios tipos de cáncer y enfermedades infecciosas.

15 En los métodos anteriores, el término "una construcción de moléculas MHC" se pretende que incluya una o más construcciones de moléculas MHC. Se hace referencia a las definiciones de "una pluralidad", "un", "una", y "el", y los significados pretendidos proporcionados anteriormente.

20 Tal y como se usa en cualquier lugar en la presente memoria, el término "células que reconocen MHC" se pretende que signifique aquellas que son capaces de reconocer y unirse a moléculas MHC. El significado pretendido de "moléculas MHC" se proporciona anteriormente. Dichas células que reconocen MHC también pueden denominarse clones de células que reconocen MHC, células diana, células que reconocen MHC diana, células que reconocen moléculas MHC diana, receptores de moléculas MHC, receptores MHC, receptores específicos de péptidos MHC, o células específicas de péptidos. El término "células que reconocen MHC" se pretende que incluya todos los subconjuntos de células normales, anormales y defectuosas, que reconocen y se unen a la molécula MHC. Realmente, es el receptor en la célula que reconoce MHC el que se une a la molécula MHC.

25 Como se ha descrito anteriormente, en enfermedades y varias afecciones, los péptidos se exponen mediante moléculas MHC, que son reconocidas por el sistema inmune y se producen células que tienen como diana dichas moléculas MHC (células que reconocen MHC). Así, la presencia de dichas células que reconocen proteína MHC es una indicación directa de la presencia de moléculas MHC que exponen los péptidos reconocidos por las células que reconocen proteína MHC. Los péptidos expuestos son indicativos y pueden estar implicados en varias enfermedades y afecciones.

30 Por ejemplo, dichas células que reconocen MHC pueden estar implicadas en enfermedades de origen inflamatorio, auto-inmune, alérgico, viral, canceroso, infeccioso, alo o xenogénico (injerto frente a huésped y huésped frente a injerto).

35 En particular, las células que reconocen MHC pueden estar implicadas en una enfermedad inflamatoria crónica del intestino tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, esclerosis, diabetes tipo I, artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis atópica, asma, melanoma maligno, carcinoma renal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer del útero, cáncer cervical, cáncer prostático, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, linfoma cutáneo, carcinoma hepático, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, enfermedad relacionada con el rechazo, enfermedad relacionada con injerto frente a huésped, o una enfermedad viral asociada con hepatitis, SIDA, sarampión, viruela, varicela, rubéola o herpes.

40 En una realización, las células que reconocen MHC se seleccionan de subpoblaciones de células T CD3+, células T gamma,delta, células T alfa,beta, células T CD4+, células T auxiliares, células T CD8+, células T supresoras, células T citotóxicas CD8+, CTL, células NK, células NKT, células LAK, y MAK.

45 En los métodos descritos anteriormente, la muestra se selecciona preferiblemente de material histológico, material citológico, tumores primarios, metástasis orgánicas secundarias, aspirados con aguja fina, tejido del bazo, muestras de médula ósea, extensiones celulares, muestras citológicas exfoliativas, preparaciones por impronta, frotis orales, frotis laríngeos, frotis vaginales, lavado bronquial, lavado gástrico, del cordón umbilical, y de fluidos corporales tales como sangre (por ejemplo, de una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de la sangre o de otras preparaciones derivadas de la sangre tales como productos de leucoféresis), de muestras de esputo, expectorados, y aspirados bronquiales Dichas muestras pueden usarse tal cual, o pueden someterse a varios métodos de purificación, descontaminación, filtración, o concentración, y/o métodos para aislar partes de la muestra como separación inmunomagnética. La muestra o parte de ésta (constituyentes de la muestra) puede tratarse además de manera que se preserve la morfología o se pare a las células de la muestra. Dichos métodos

para el tratamiento de las muestras son fácilmente conocidos por el experto en la técnica. El término "células de la muestra" tal y como se usa en cualquier lugar en la presente memoria se pretende que signifique la muestra como tal o partes aisladas de ésta, se apliquen o no varios tratamientos.

5 La construcción de moléculas MHC empleada en los métodos de la invención puede marcarse, como se ha mencionado anteriormente, directamente o indirectamente de manera que se facilita la observación de la unión. Así, la construcción de moléculas MHC puede marcarse adecuadamente de manera que se permita la observación por inspección en un microscopio, por luz, por fluorescencia, por transmisión electrónica, o por citometría de flujo.

10 Debe entenderse que una construcción de moléculas MHC puede emplearse en los métodos así como varias (una pluralidad de) construcciones de moléculas MHC (es decir, una o más), dependiendo de la información deseada. El número total de construcciones de moléculas MHC así como la combinación real de moléculas MHC, péptidos, opcionalmente compuestos biológicamente activos, y opcionalmente compuestos marcados es en principio ilimitado.

15 Los métodos de la invención descritos anteriormente pueden ser adecuadamente éstos, en los que la muestra que se va a analizar se monta en un soporte. El soporte puede ser adecuadamente una superficie sólida o semi-sólida. Las superficies sólidas y semi-sólidas adecuadas son fácilmente conocidas en la técnica, e incluyen portaobjetos de vidrio, lechos, partículas, membranas, filtros, membranas de filtro, portaobjetos de polímero, membranas de polímero, portaobjetos de cámara, revestimientos, monturas, placas y placas petri.

A continuación, se proporciona una discusión breve de los procedimientos específicos para llevar a cabo los métodos de la invención.

Métodos citológicos e histológicos

20 Los métodos descritos en la presente memoria pueden realizarse como métodos citológicos e histológicos (métodos con muestra montada, "sample-mounted").

25 Por el término "montado" se quiere decir puesto en o unido a un soporte sustancialmente plano. Se incluye el posicionamiento de la muestra de tejido o célula en un soporte por ejemplo, para ver en un portaobjetos de microscopio. La muestra puede unirse para prevenir además que se caiga o se deslice durante el manejo del soporte. El método de unión al soporte incluye el basado en física, atracción capilar, adhesivos y unión química. La muestra puede fijarse o no fijarse.

Como se ha mencionado anteriormente, la muestra puede purificarse o concentrarse, o las células pueden aislarse antes del análisis. La muestra también puede incluirse en parafina y seccionarse antes del análisis. Dichos procedimientos son fácilmente conocidos por el experto en la técnica.

30 En particular, el soporte puede ser un portaobjetos de vidrio, una membrana, un filtro, un portaobjetos de polímero, un portaobjetos con cámara, una placa, o una placa petri.

35 La muestra o partes de ésta pueden crecerse o cultivarse adecuadamente directamente en el soporte antes del análisis. Los ejemplos de medios de cultivo adecuados incluyen medio de cultivo de origen biológico tal como suero sanguíneo o extracto de tejido; medios sintéticos químicamente definidos; o mezclas de éstos. Los cultivos celulares se crecen habitualmente bien como capas únicas de células, por ejemplo, en una superficie de vidrio o plástico, en matraces o en portaobjetos con cámara, o como una suspensión en un medio líquido o semisólido. Las células pueden transferirse a y montarse en un soporte más adecuado, por ejemplo, un portaobjetos de vidrio. Si se crecen en un portaobjetos con cámara, que es adecuado, por ejemplo, para ver en un microscopio, las células pueden permanecer potencialmente en el soporte.

40 Sin embargo, no se necesita crecer o cultivar las células antes del análisis. Frecuentemente, a muestra se analizará directamente sin cultivo. Debe entenderse que las muestras para análisis directo deben experimentar los procedimientos de procesamiento descritos anteriormente.

45 Así, la muestra puede analizarse, bien directamente o después de haber experimentado una o más etapas de procesamiento, principalmente en dos tipos principales de métodos, métodos in situ (análisis in situ) y métodos in vitro (análisis in vitro).

50 En este contexto, los métodos in situ (análisis in situ) deben entenderse como ensayos, en los que la morfología de las células de la muestra se preserva esencialmente. Por "se preserva esencialmente" se quiere decir que se preserva la morfología global, lo que hace posible identificar parte o todas las composiciones estructurales del tejido o células. Los ejemplos son análisis de frotis, biopsias, preparaciones por impronta y extensión de la muestra en el soporte. Las muestras pueden someterse entre otros a fijación, permeabilización, u otras etapas de procesamiento antes del análisis.

55 Los métodos in vitro deben entenderse como métodos, en los que no se preserva la morfología global. En el caso de métodos in vitro, la muestra se somete a un tratamiento, que disrumpe la morfología de la estructura celular. Dichos tratamientos son conocidos para el experto en la técnica e incluyen tratamiento con disolventes orgánicos, tratamiento con reactivos caotrópicos fuertes tales como altas concentraciones de tiocianato de guanidina,

tratamiento enzimático, tratamiento con detergente, molienda de lechos, tratamiento con calor, sonicación y/o aplicación de una prensa French.

5 Los materiales histológicos y citológicos incluyen biopsias y otras muestras de tejido. En general, la citología es el estudio de la estructura de todos los componentes normales y anormales de las células y los cambios, movimientos, y transformaciones de dichos componentes. Las disciplinas de la citología incluyen citogenética, citoquímica, y anatomía microscópica. Las células se estudian directamente en el estado vivo o se matan (fijan) y preparan, por ejemplo, por inclusión, seccionamiento, o tinción para investigación en microscopios de campo brillante o electrónico.

10 Un procedimiento de citología muy conocido es el procedimiento médico del ensayo Papanicolaou usado para detectar cáncer del cuello uterino. Se toma un raspado, cepillado, o frotis, de la superficie de la vagina o cuello uterino y se prepara en un portaobjetos y se tiñe para examen microscópico y análisis citológico. La apariencia de las células determina si son normales, sospechosas, o cancerosas.

Por histología se entiende generalmente el estudio de grupos de células especializadas denominados tejidos que se encuentran en la mayor parte de las plantas y animales multi-celulares.

15 Los histólogos estudian la organización de tejidos a todos los niveles, desde el órgano completo hasta los componentes moleculares de las células. Los tejidos animales se clasifican, por ejemplo, como tejido epitelial, conectivo, muscular y nervioso. La sangre y linfa se clasifican comúnmente algunas veces separadamente como tejido vascular.

20 Estos tipos de tejidos se combinan de diferentes maneras en el organismo para formar órganos característicos. La manera en la que las células están conectadas y organizadas se denomina a veces la morfología del tejido y proporciona una información valiosa acerca del estado de las células y el tejido.

25 Se usa una variedad de técnicas para los estudios histológicos, incluyendo cultivo tisular, uso de varios fijadores y tinciones, el uso de un microtomo para preparar secciones finas, microscopía óptica, microscopía electrónica, y difracción de rayos X. El campo de la histología también incluye histoquímica, que es el estudio de la composición química de las estructuras tisulares.

La investigación histológica incluye el estudio de muerte y regeneración tisular y la reacción del tejido al daño u organismos invasores. Como el tejido normal tiene una apariencia característica, el examen histológico se utiliza frecuentemente para identificar el tejido enfermo.

El término "morfología" se usa tanto respecto a células individuales como tejidos.

30 En general, hay dos categorías de materiales histológicos. El más común es una muestra de tejido fijada, incluida en parafina, frecuentemente material de archivo. Estas muestras se fijan, habitualmente usando un fijador basado en formalina, se deshidratan a xileno, se incluyen en parafina o plástico (por ejemplo, Epon, Araldite, Lowicryl, LR White o poliacrilamida), se seccionan en un portaobjetos, se desparafinan o tratan de otra forma, se re-hidratán, y se tiñen.

35 La segunda categoría incluye preparaciones, que son tejidos y/o células frescos, que generalmente no se fijan con fijadores basados en aldehído. Dichas muestras se ponen bien directamente en un portaobjetos o cubreobjetos, o se congelan y seccionan en portaobjetos. Dichas muestras se fijan, habitualmente con un fijador basado en alcohol o acetona, y se tiñen. Estas muestras incluyen comúnmente materiales de biopsia, que pueden analizarse mientras el procedimiento quirúrgico está en progreso (secciones congeladas), preparaciones citológicas (incluyendo, por ejemplo, preparaciones por impronta y frotis de sangre), y tejidos, que van a analizarse histoquímicamente.

40 El método para ver las muestras teñidas incluye microscopios de campo brillante o escáneres, microscopios o escáneres fluorescentes, microscopio electrónico de transmisión (TEM) o microscopio electrónico de barrido (SEM).

45 La inmunotinción requiere una serie de etapas de tratamiento realizadas en una sección de tejido montada en un portaobjetos para resaltar mediante tinción selectiva determinados indicadores morfológicos de los estados de la enfermedad. Las etapas típicas incluyen pre-tratamiento de la sección de tejido para reducir la unión no específica, poner en contacto con reactivo específico, y varias técnicas de visualización, opcionalmente separadas por etapas de lavado. También puede aplicarse contratinción, por ejemplo, con hematoxilina, tinción de Ehrlich, rojo Sirius, verde Metilo, azul de metileno, y semejantes. Pueden aplicarse incubaciones a temperatura ambiente o a temperaturas ligeramente elevadas, habitualmente alrededor de 40°C, y el tejido debe protegerse continuamente de la deshidratación.

50 En lo que sigue, se describen algunas de las etapas individuales en un procedimiento de tinción.

Los fijadores son necesarios para preservar las células y tejidos de una manera reproducible y semejante a la vida. Para conseguir esto, bloques de tejido, secciones, o frotis se sumergen en un fluido fijador, o en el caso de los frotis se secan. Los fijadores estabilizan las células y tejidos protegiéndolos de esta manera de los rigores de las técnicas de procesamiento y tinción.

Los tipos de fijador incluyen formalina (formaldehído acuoso) y formalina tamponada neutra (NBF) está entre los usados más comúnmente. Otros fijadores incluyen glutaraldehído, acroleína, carbodiimida, imidatos, benzoequinona, ácido ósmico y tetraóxido de osmio.

5 Las muestras de biopsia frescas, preparaciones citológicas (incluyendo preparaciones por impronta y frotis de sangre), secciones y tejidos congelados para análisis inmunohistoquímico se fijan comúnmente en disolventes orgánicos, incluyendo etanol, metanol y/o acetona.

10 Los métodos para unir o montar secciones en portaobjetos incluyen usar portaobjetos limpios y tomar como base la atracción capilar y sin adhesivos. Otras técnicas incluyen pegamentos como glicerina de clara de huevo, mezclas glicerina-gelatina, pegamento de acetato de polivinilo, gelatina cromo-alúmina y recubrimiento con poli lisina. El calentamiento o "quemado" de la sección como un medio de facilitar el montaje de la sección debe usarse con cuidado, ya que el tejido puede destruirse.

Para facilitar el reconocimiento específico en tejido fijado, frecuentemente es necesario recuperar o desenmascarar las dianas mediante pre-tratamiento de las muestras para incrementar la reactividad de la mayoría de las dianas.

15 La recuperación de las dianas incluye una variedad de métodos por los cuales se maximiza la disponibilidad de la diana para la interacción con un reactivo de detección específico. Las técnicas más comunes son digestión enzimática con una enzima proteolítica (por ejemplo, Protineasa, pronasa, pepsina, papaína, tripsina o neuraminidasa) en un tampón apropiado o recuperación de epítipo inducida por calor (HIER) usando irradiación de microondas, calentamiento en un horno normal, autoclavar o cocinado con presión en un tampón con pH estabilizado apropiadamente, que contiene habitualmente EDTA, Tris-HCl, citrato, urea, glicina-HCl o ácido bórico.

20 La penetración de los reactivos a través de la sección de tejido puede incrementarse usando detergentes durante el pre-tratamiento de las secciones o preparaciones citológicas, o como aditivos del medio de dilución y tampones de lavado.

Además, la relación señal a ruido puede incrementarse por diferentes métodos físicos, incluyendo la aplicación de vacío y ultrasonidos, o congelando y descongelando la sección antes o durante la incubación de los reactivos.

25 Los sitios de unión a biotina endógenos o actividad enzimática endógena (por ejemplo, fosfatasa, catalasa o peroxidasa) pueden eliminarse como una etapa en el procedimiento de tinción.

30 De manera similar, se usa ampliamente el bloqueo de los sitios de unión inespecíficos con proteínas inertes como HSA, BSA, ovalbúmina, suero de ternera fetal u otros sueros, o detergentes como Tween20, Tritón X-100, Saponina, Brij o Plurónicos. El bloqueo de los sitios de unión inespecíficos en el tejido o células con versiones no específicas no marcadas y diana de los reactivos específicos.

35 Las técnicas de visualización estándar utilizadas en inmunocitoquímica pueden no usarse directamente para la tinción de receptores, ya que la unión se basa en la baja fuerza de unión de las moléculas MHC y no los anticuerpos de alta avidéz o sondas de ADN usados normalmente. También, la naturaleza polimorfa y de alguna manera sensible de la molécula MHC la distingue, por ejemplo, de los anticuerpos monoclonales usados en inmunocitoquímica. Por otra parte, con el fin de tener un uso práctico, los procedimientos de tinción específicos de receptor y los métodos usados deben asemejarse a los métodos actuales.

La presente invención hace posible sorprendentemente teñir receptores específicos usando una metodología que se asemeja a los procedimientos de inmunocitoquímica rutinarios.

40 Para una introducción general a las diferentes técnicas de visualización de inmunocitoquímica, véase, por ejemplo, Lars-Inge Larsson (ref. 23).

Los métodos de detección usados más comúnmente en inmunohistoquímica son la visualización directa de fluorescencia o partículas de oro y detección colorimétrica mediada por enzimas.

45 Para estudios de fluorescencia directa, los marcadores pueden ser, por ejemplo, 5- (y 6)-carboxifluoresceína, 5- ó 6-carboxifluoresceína, ácido 6-(fluorescein)-5-(y 6)-carboxamido hexanoico, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, tetrametilrodamina, y agentes de tinción tales como Cy2, Cy3, y Cy5, cumarina sustituida opcionalmente incluyendo AMCA, PerCP, ficobiliproteínas incluyendo R-ficoeritrina (RPE) y aloficoeritrina (APC), Rojo Texas, Rojo Princeton, proteína verde fluorescente (GFP) y análogos de ésta, y conjugados de R-ficoeritrina y aloficoeritrina y, por ejemplo, Cy5 o Rojo Texas, y marcadores fluorescentes inorgánicos basados en nanocristales semiconductores (como nanocristales quantum dot y Qdot™), y marcadores fluorescentes de tiempo resuelto basados en lantánidos
50 como Eu3+ y Sm3+.

Pueden usarse oro o plata coloidal como marcadores directos para estudios inmunocitoquímicos para microscopía electrónica y microscopía óptica. La amplificación de la señal puede obtenerse mediante un aumento de plata adicional de las partículas de oro coloidal.

Los métodos enzimáticos generales usan avidina o estreptavidina-biotina marcada (LAB), complejo avidina o estreptavidina-biotina (ABC), complejo enzima anti-enzima (por ejemplo, PAP y APAAP), complejo anticuerpo-enzima basado en polímero dextrano directo (por ejemplo, EPOS de DAKO); complejo anticuerpo-enzima basado en polímero dextrano indirecto (por ejemplo, EnVision de DAKO) o complejo enzima anti-enzima doble puente.

- 5 La tinción enzimática usa marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (GAL), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, beta-N-acetil-glucosaminidasa, invertasa, Xantina Oxidasa, luciferasa de luciérnaga y glucosa oxidasa (GO).

- 10 Los ejemplos de sustratos usados comúnmente para peroxidasa de rábano incluyen 3,3'-diaminobencidina (DAB), diaminobencidina con aumento de níquel, 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), dihidrocloruro de bencidina (BDHC), reactivo de Haker-Yates (HYR), Indofán azul (IB), tetrametil bencidina (TMB), 4-cloro-1-naftol (CN), α -naftol pironina (α -NP), o-dianisidina (OD), 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP), azul de nitro tetrazolio (NBT), cloruro de 2-(p-yodofenil)-3-p-nitrofenil-5-fenil tetrazolio (INT), azul de tetranitro tetrazolio (TNBT), 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-galactósido/ferro-ferricianuro (BCIG/FF).

- 15 Los ejemplos de sustratos usados comúnmente para fosfatasa alcalina incluyen Naftol-AS-B1-fosfato/rojo rápido TR (NABP/FR), Naftol-AS-MX-fosfato/rojo rápido TR (NAMP/FR), Naftol-AS-B1-fosfato/rojo rápido TR (NABP/FR), Naftol-AS-MX-fosfato/rojo rápido TR (NAMP/FR), Naftol-AS-B1-fosfato/fucsina nueva (NABP/NF), bromocloroindolil fosfato/azul de nitro tetrazolio (BCIP/NBT), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-d-galactopiranósido (BCIG).

- 20 Uno de los sistemas de detección más potentes es la deposición de informador catalizada (CARD); este método de amplificación se basa en la deposición de tiramida marcada en tejido mediante la acción enzimática de HRP. Después de la inmunotinción con HRP, la tiramida marcada se aplica y se une cerca del sitio de la actividad HRP. La tiramida unida y marcada se visualiza por fluorescencia tradicional o detección colorimétrica mediada por enzima.

Los sistemas de tinción automatizados se han introducido para reducir el coste, incrementar la uniformidad de la preparación de portaobjetos, reducir el trabajo rutinario laborioso y lo más significativamente reducir los errores humanos en el procedimiento.

- 25 Los sistemas automatizados actuales pueden manejar cualquier ensayo inmunoquímico incluyendo ensayos que se basan en inmunofluorescencia, procedimientos de inmunoensayo indirectos, métodos de tinción con enzima u oro. Realizan todas las etapas del ensayo inmunohistoquímico independientemente de la complejidad o su orden, en el tiempo y temperatura prescritos.

- 30 Las técnicas de inmunocitoquímica han usado tradicionalmente anticuerpos específicos para la identificación y visualización de antígenos específicos. La técnica es compleja, se necesitan muchas etapas y moléculas con altas afinidades para la tinción específica.

Por la presente invención, las técnicas de inmunocitoquímica se han mejorado para permitir la identificación de la cantidad mínima de receptores delicados, que no está basada en interacciones anticuerpo-antígeno.

- 35 La tinción de receptores específicos de péptido MHC en tejido montado, por ejemplo, en portaobjetos será una herramienta de diagnóstico muy potente, permitiendo la identificación de receptores específicos de péptido MHC, opcionalmente combinado con información morfológica, si se desea.

Mediante la combinación adicional de información morfológica con la doble tinción de células específicas y receptores específicos, puede obtenerse información de diagnóstico útil adicional.

Método de citometría de flujo

- 40 Las construcciones de moléculas MHC de la invención se usan adecuadamente como reactivos marcador para identificar células que reconocen MHC por citometría de flujo. Esto permite además el análisis de marcadores superficiales adicionales como, por ejemplo, epítomos de anticuerpo expresados por CD8, CD4, CD3, CD94/NKG2-A/C y KIR.

- 45 Una ventaja adicional de las construcciones de moléculas MHC de la invención es que mediante el acoplamiento de análisis de citometría de flujo con separación de células a alta velocidad, pueden realizarse ensayos funcionales en células separadas sin la necesidad de expandir in vitro las células que se van a analizar.

En el citómetro de flujo, pueden identificarse diferentes células por su distinta morfología celular como densidad, forma y tamaño. La morfología tisular como tal no es visible a partir de los datos obtenidos del citómetro de flujo ya que las células se rompen.

- 50 La citometría de flujo es un sistema para medir células, lechos o partículas mientras se mueven en una corriente líquida, en la denominada celda de flujo, mediante un haz de láser o de luz que pasa un área sensora. Se mide la dispersión relativa de la luz y la fluorescencia discriminada por color de las partículas.

Un citómetro de flujo consiste en general en una fuente de luz, celda de flujo, óptica para focalizar la luz de diferentes colores en un detector, amplificador de la señal y procesador y un ordenador para registrar y analizar los datos.

5 Los láseres se usan como la fuente de luz preferida en los citómetros de flujo modernos. El láser usado más comúnmente es el láser de ión argón. Éste produce una línea principal a 488 nm, que proporciona una fuente de luz azul para excitación, por ejemplo, de fluoresceína, ficoeritrina, conjugados en tándem y para yoduro de propio usado en las mediciones de ADN. En la celda de flujo, las células se alinean mediante focalización hidrodinámica, de manera que pasan a través de los haces de láser una cada vez.

10 La dispersión de la luz se utiliza para identificar la población de células o partículas de interés, mientras la medición de la intensidad de fluorescencia proporciona información específica acerca de células individuales.

Las células individuales mantenidas en la corriente de fluido se hacen pasar a través de uno o más haces de láser. Las células dispersan la luz láser, que al mismo tiempo hace que los marcadores fluorescentes emitan luz a varias frecuencias. Los tubos fotomultiplicadores (PMT) convierten la luz en señales eléctricas y se recogen los datos celulares.

15 Lo que hace a la citometría de flujo una técnica tan poderosa es su capacidad de medir varios parámetros en muchos miles de células individuales en un tiempo muy corto, mediante la medición de su fluorescencia y la manera en la que dispersan la luz. Como un ejemplo, usando luz azul para la excitación, es posible medir fluorescencia roja, verde y naranja y la cantidad de luz dispersada, tanto frontal como a ángulos rectos respecto al haz, en cada célula en una población de miles.

20 Muchos instrumentos pueden medir al menos cinco parámetros diferentes. Como todos los parámetros no pueden combinarse para mostrarse simultáneamente de una manera correlacionada, se emplea un sistema denominado "gating". Se definen las regiones de interés- o "Gates"-, permitiendo la selección de poblaciones de células específicas para mostrar parámetros adicionales. Un citómetro de flujo puede usarse para analizar sub-poblaciones de células, que se han marcado fluorescentemente, con velocidad y exactitud. También es posible la separación
25 tomando como base otras características, por ejemplo, tamaño.

Los instrumentos de citometría de flujo generan simultáneamente tres tipos de datos: 1) La dispersión frontal (FSc) proporciona el tamaño aproximado de la célula o partícula, 2) La dispersión lateral u ortogonal (SSc) proporciona la complejidad o granularidad de la célula o partícula, y 3) el marcaje fluorescente se usa para investigar, por ejemplo, la estructura y función celulares.

30 La dispersión frontal y lateral se usan para la identificación preliminar de las células. En una muestra de sangre periférica, por ejemplo, pueden definirse poblaciones de linfocitos, monocitos, y granulocitos tomando como base la dispersión frontal y lateral. La dispersión frontal y lateral se usan para excluir fragmentos celulares y células muertas. Las partículas, por ejemplo, pueden identificarse por su tamaño y/o su fluorescencia.

35 Las poblaciones de células o partículas pueden representarse en histogramas de un único parámetro o parámetro dual. Las señales de dispersión de la luz y fluorescencia pueden analizarse después de la amplificación lineal o logarítmica. Una vez se ha identificado la población de células o partículas que se va a analizar, se determina la fluorescencia asociada con anticuerpos o agentes de tinción unidos después de haber establecido la fluorescencia de fondo.

40 Algunos citómetros de flujo son capaces de separar físicamente células o partículas en poblaciones específicas. Esto se hace lo más comúnmente por deflexión electrostática de gotitas cargadas que contienen una célula. La celda de flujo vibra y causa que la corriente de líquido se rompa en gotitas pequeñas al salir de la tobera de la salida. En el momento en el que una célula o partícula de interés está dentro de la gotita que se está formando, la celda de flujo se carga- cargando así la gotita. La corriente de gotitas pasa a través de una pareja de placas cargadas eléctricamente, y las gotitas que están cargadas (que contienen las células o partículas de interés) se deflexionan en
45 un recipiente de recogida.

El campo eléctrico creado entre las placas puede dirigir a las células o partículas hacia uno de varios receptáculos de recogida especificados por el usuario. Las gotitas no cargadas fluyen a un recipiente de desecho.

50 El análisis de las concentraciones de células o subconjuntos de células, referido frecuentemente como "recuento absoluto", puede ser además interesante para el diagnóstico médico o para monitorizar el estado de células en cultivos celulares u otros procesos biotecnológicos.

El citómetro de flujo es capaz de cribar rápidamente grandes números de células mucho más allá de la capacidad de los métodos patológicos o citológicos tradicionales. La información obtenida ayuda en el diagnóstico, clasificación, y pronóstico de una variedad de enfermedades.

Las aplicaciones en las que puede aplicarse la citometría de flujo se han extendido rápidamente desde la separación de células, hasta la medida de antígenos de la superficie celular, y análisis de ADN para ayudar en la interpretación de trastornos malignos.

5 Los usos comunes para la citometría de flujo en el laboratorio clínico rutinario incluyen inmunofenotipado de neoplasmas hematopoyéticos, evaluación del estado inmune, especialmente cuantificación de células T CD4+ en pacientes positivos para VIH, y análisis del ADN en el ciclo celular de tumores sólidos.

Las diferentes poblaciones de células que componen el sistema hematopoyético expresan antígenos de superficie celular claramente diferentes en varios estadios de maduración. Mediante la detección y medida de estos antígenos expresados, la citometría de flujo puede ayudar en la clasificación del linaje celular de leucemia y linfoma.

10 Aunque no se pretende que sea una modalidad de diagnóstico independiente, la citometría de flujo es capaz frecuentemente de sub-clasificar las malignidades hematopoyéticas más allá de las capacidades de las técnicas morfológicas y citoquímicas tradicionales.

15 Los usos rutinarios más comunes de la citometría de flujo han sido la medida de antígenos de superficie (marcadores) por marcaje inmunofluorescente usando anticuerpos monoclonales. Los marcadores usados comúnmente son células B totales, células T totales y subconjuntos de células T. A los marcadores para células T totales, células T auxiliares y células T supresoras se les han asignado las categorías de diferenciación de grupo (CD) de CD3, CD4, y CD8, respectivamente. Este espectro de marcadores, de los cuales hay más de 45 en total, se usa para la clasificación clínica de estados de inmunodeficiencia, leucemias linfoides, enfermedades autoinmunes y para monitorizar su respuesta a terapia.

20 Por ejemplo, las medidas de CD4 y CD8 son especialmente útiles para monitorizar el progreso de SIDA, ya que las células CD4+ se deplecionan por la infección con VIH, mientras las células CD8+ persisten. El número absoluto de células CD4+ es también un marcador de progresión de infección por VIH a SIDA más evidente. La proporción CD4/CD8 también puede usarse para evaluar el éxito de terapia inmunosupresora con ciclosporina A en pacientes con trasplante.

25 Para la evaluación del estado inmune, se identifican y cuantifican típicamente sub-poblaciones de linfocitos por el citómetro de flujo utilizando anticuerpos monoclonales frente a varios antígenos de superficie celular. Los pacientes con enfermedad de inmunodeficiencia adquirida o congénita y los pacientes en terapia con fármacos inmunosupresores presentan alteraciones características en las poblaciones de linfocitos.

30 El procedimiento de tinción directa típico para citometría de flujo puede incluir una o varias de las etapas siguientes además de etapas de lavado y mezclado:

Fijación de las células, por ejemplo con formaldehído tamponado, permeabilización, adición de reactivo específico de diana marcado fluorescentemente, incubación, centrifugación, aspiración del sobrenadante del sedimento celular, resuspensión, dilución y análisis en el citómetro de flujo.

35 Se han reportado varios ejemplos de detección y análisis cuantitativo basados en citometría de flujo de subpoblaciones inmunes proliferativas de células T expandidas in vitro en muestras de sangre de pacientes. Los ejemplos muy conocidos de péptidos TAA antigénicos reconocidos por células T que se han monitorizado en pacientes sometidos a terapia inmune específica de tumor son MART-1 (27-35), gp100 (154-162), y NY-ESO (157-165). Otras moléculas MHC interesantes incluyen alelos HLA A, HLA B, HLA C, H-2, DR y HLA E para detectar una variedad de receptores con bajas afinidades intrínsecas, por ejemplo, TCR específicos de péptido y receptores NK como CD94/NKG2-A/C y KIR.

40 La interacción entre péptido/molécula MHC y el contra receptor específico está dirigida por una afinidad relativamente alta, que es esencial para la función de teñido. Así, los clones que reconocen células MHC de baja afinidad, que interactúan con complejos sub-dominantes péptido/molécula MHC, pueden "escapar" potencialmente al análisis por citometría de flujo. Esto se ha observado de hecho en el caso de los tetrámeros de la técnica anterior en procedimientos de citometría de flujo. Sin embargo, por la construcción de la presente invención, esta desventaja en los procedimientos de citometría de flujo se elimina.

45 Las construcciones de moléculas MHC poli-ligando de la invención se unen más fuertemente a receptores de células que reconocen MHC específicas comparado con los tetrámeros de la técnica anterior, lo que es necesario para los procedimientos de citometría de flujo fiables. Las construcciones de la invención son útiles por lo tanto en particular para análisis por citometría de flujo de incluso subpoblaciones sutiles de células que reconocen MHC. La aidez de unión incrementada de las construcciones de moléculas MHC de la invención permite la detección de células que reconocen MHC que expresan receptores de baja afinidad. Las interacciones aumentadas también permiten la detección de incluso poblaciones muy pequeñas de células que reconocen MHC en muestras de sangre sin la necesidad de expansión in vitro. Se considera por lo tanto que las construcciones de moléculas MHC de la invención son útiles para la monitorización directa por citometría de flujo de todos los tipos de células que reconocen MHC en muestras de sangre.

Las construcciones de moléculas MHC poli-ligando de la invención también permiten una mejor separación de células que reconocen MHC específicas e inespecíficas y, así, aumentan la utilización de separación celular a alto flujo de células que reconocen MHC específicas de antígeno.

Otras técnicas

- 5 También se cree que las construcciones de moléculas MHC de la invención pueden aplicarse adecuadamente en las técnicas denominadas de "flotación libre".

En los procedimientos de tinción que usan las denominadas "técnicas de flotación libre" una sección de tejido se pone en contacto con diferentes reactivos y tampones de lavado en suspensión o flotando libremente en contenedores apropiados, por ejemplo, tubos de micro centrifuga.

- 10 Las secciones de tejido pueden transferirse de tubo a tubo con diferentes reactivos y tampones durante el procedimiento de tinción usando, por ejemplo, un dispositivo "semejante a un anzuelo", una espátula o un anillo de vidrio.

Los diferentes reactivos y tampón también pueden cambiarse por decantación cuidadosa o succión con vacío. Alternativamente, los contenedores con las secciones de tejido pueden vaciarse en una red de tinción especial, como las "Netwells" de Corning y la sección de tejido puede lavarse antes de ser transferida de nuevo al tubo para la siguiente etapa de tinción.

- 15

Todas las etapas individuales del procedimiento de tinción, incluyendo, por ejemplo, fijación, recuperación de antígeno, lavado, incubación con reactivos de bloqueo, reactivos inmuno-específicos y, por ejemplo, el revelado catalizado enzimáticamente de los agentes de tinción coloreados, se hacen mientras la sección de tejido está flotando libremente o retenida en las redes. Después del revelado de la tinción, la sección de tejido se monta en portaobjetos, se seca, antes de contratarse y cubrirse con cubreobjetos antes de ser analizada, por ejemplo, en un microscopio.

- 20

Ocasionalmente, la sección de tejido se monta en portaobjetos después de la incubación crítica con los reactivos inmuno-específicos. El resto del proceso de tinción se realiza en las secciones de tejido montadas en portaobjetos.

- 25 El método de flotación libre se ha usado principalmente en secciones de tejido gruesas. Es importante que las secciones no se sequen nunca durante el proceso de tinción.

Las ventajas del método de flotación libre incluyen una penetración uniforme y buena de los reactivos de tinción inmunohistoquímica. El método de flotación libre permite altas concentraciones de reactivos y un buen mezclado.

Composiciones que comprenden construcciones de moléculas MHC

- 30 Las composiciones (kits) que comprenden construcciones de moléculas MHC también son una realización importante de la presente invención. Dichas composiciones pueden formularse de una manera tal que las haga listas para uso en hospitales y laboratorios. También pueden formularse de manera que se permita al usuario modificarlas o usarlas según desee.

- 35 Debe entenderse que la composición puede incluir una construcción de moléculas MHC o varias construcciones de moléculas MHC, dependiendo del uso pretendido. El número total de construcciones de moléculas MHC así como la combinación real de moléculas MHC y péptidos es en principio ilimitado.

Así, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden una construcción de moléculas MHC como se ha definido anteriormente, y opcionalmente otros componentes tales como tampones y/o medios de visualización. Las moléculas MHC de la construcción de moléculas MHC puede ser moléculas MHC rellenas con péptido o sin péptido como se ha definido anteriormente, o una mezcla de éstas. La construcción de moléculas MHC y opcionalmente otros componentes puede proporcionarse en contenedores separados o en el mismo contenedor.

- 40

Tal y como se usan a lo largo del presente contexto, los términos "uno o más", "una pluralidad", "un", "una", y "el" tienen el significado indicado anteriormente.

- 45 En una realización, la composición de la invención comprende una construcción de moléculas MHC como se ha definido anteriormente en un medio de solubilización. La composición puede ser tal, en la que la construcción de moléculas MHC comprende moléculas MHC rellenas con péptido, o tal, en la que la construcción de moléculas MHC comprende moléculas MHC sin péptido. En el último caso, la composición puede ser tal, en la que los péptidos que rellenan las moléculas MHC sin péptido y la construcción de moléculas MHC que comprenden moléculas MHC sin péptido se proporcionan separadamente.

- 50 En otra realización, la composición de la invención comprende una construcción de moléculas MHC como se ha definido anteriormente, en la que la construcción de moléculas MHC se inmoviliza en un soporte sólido o semi-sólido. Los soportes sólidos y semi-sólidos adecuados se indican anteriormente. La composición puede ser tal, en la que la construcción de moléculas MHC comprende moléculas MHC rellenas con péptido, o tal, en la que la

construcción de moléculas MHC comprende moléculas MHC sin péptido. En el último caso, la composición puede ser tal, en la que los péptidos para rellenar las moléculas MHC sin péptido se proporcionan separadamente.

5 En particular las construcciones de moléculas MHC pueden proporcionarse en una forma, en la que las moléculas MHC están rellenas con péptidos de baja afinidad. Así, puede ser posible intercambiar estos péptidos de baja afinidad con péptidos de mayor afinidad para un uso particular. Esta aplicación puede ser particularmente valiosa cuando se proporcionan las composiciones (kits). El llenado de las moléculas MHC con péptidos de baja afinidad tiene la ventaja de estabilizar las moléculas MHC, mientras se proporcionan los beneficios de las moléculas MHC sin péptido.

En lo que sigue, se describe la producción de moléculas MHC, péptidos, y construcciones de moléculas MHC.

10 Producción de moléculas MHC, péptidos, y construcciones de moléculas MHC

En la presente memoria, se describe la producción de moléculas MHC y entre otros su uso para moléculas MHC bien definidas organizadas como compuestos poli-ligando en una molécula vehicular (construcciones de moléculas MHC) para conseguir la unión específica de la molécula MHC a sus células diana inmunocompetentes (células que reconocen MHC) que expresan receptores de células T y receptores de células NK apropiados.

15 Producción de la molécula MHC

Se ha demostrado que algunas moléculas MHC son difíciles de obtener a partir de fuentes naturales, es decir, células eucariotas, ya que están contaminadas o pre-ocupadas con péptidos no deseados durante la biosíntesis celular.

20 El progreso tecnológico reciente permite la producción de MHC Clase I así como MHC Clase II vacías de péptido pero funcionales usando ADNc apropiado ligado en un vector de expresión bacteriano. Un procedimiento de plegamiento in vitro desarrollado recientemente Plegamiento de Proteína Oxidada (OPF) permite la producción de moléculas MHC Clase I bien definidas, véase WO 2000/15665 (ref. 31). El método puede usarse en cualquier esquema de producción de proteínas (ya sea en procariotas o eucariotas) en el que la proteína (por ejemplo, cuerpos de inclusión) en algún momento durante la producción se solvata en condiciones caotróficas (por ejemplo, urea) que no disrumen los enlaces disulfuro establecidos y apropiados. Brevemente, el método OPF se aprovecha de los enlaces disulfuro pre-formados que guían a la molécula MHC desnaturalizada a través de una ruta de plegamiento eficiente y rápida en tampones con las condiciones apropiadas (como pH, salinidad). Como ejemplo, la molécula MHC Clase I vacía de péptido y relativamente estable se forma instantáneamente por dilución de la molécula de cadena pesada desnaturalizada con enlaces disulfuro apropiados en un tampón que contiene exceso de β_2m funcional. Este estado intermedio de cadena pesada MHC Clase I plegada *de novo* está controlado estrictamente por la presencia de β_2m . La adición posterior de péptido induce cambios moleculares en la molécula de cadena pesada y da lugar a la formación de moléculas MHC Clase I estables y funcionales. Así, el método OPF permite la producción de molécula MHC Clase I en dos formas distintas, concretamente a) como una molécula rellena con péptido, que es extremadamente estable y se une a células T, y b) como una molécula sin péptido, parcialmente madura (moléculas MHC "vacías"), que es razonablemente estable y fácilmente receptiva a péptido. En comparación, el plegamiento convencional de molécula MHC producida por bacterias requiere la presencia tanto de β_2m como péptido y da lugar, consecuentemente, sólo a moléculas MHC rellenas con péptido estables.

40 Los estados oxidados, por ejemplo, de subunidades MHC Clase I, sólo pueden obtenerse por purificación bioquímica, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño y de intercambio iónico de subunidades individuales de cuerpos de inclusión bacterianos solubilizados con urea o a partir de moléculas MHC Clase I desnaturalizadas producidas en células eucariotas, por ejemplo, células CHO.

45 Las moléculas MHC también pueden generarse por tecnología recombinante para obtener componentes bien definidos y altamente purificados etiquetados con un resto apropiado (por ejemplo, un sitio de biotilación) para unión a la molécula vehicular mediante una entidad de unión, como, por ejemplo, estreptavidina. Las moléculas MHC y moléculas semejantes a MHC sólo se obtienen con dificultad de fuentes naturales, ya que están cargadas con muchos péptidos diferentes en los compartimentos intracelulares durante la biosíntesis. Los métodos eficientes para la producción de moléculas MHC también son pre-requisitos para superar el polimorfismo extremo del locus MHC. En la población humana existen más de 400 alelos diferentes HLA A, HLA B y HLA C, y existen más de 200 alelos HLA D. Esta diversidad molecular tiene, como se ha indicado anteriormente, un propósito inmunológico, pero es un obstáculo práctico para la producción de MHC porque es necesario generar muchas moléculas MHC diferentes e individualmente optimizadas, validadas, caracterizadas, almacenadas, etc. Las moléculas MHC recombinantes que presentan péptidos bien definidos pueden obtenerse, sin embargo, con alta eficacia por plegamiento in vitro de subunidades desnaturalizadas y pre-oxidadas (es decir, pesada y ligera β_2m de moléculas MHC Clase I, y cadenas α, β de moléculas MHC Clase II) de moléculas MHC que se han producido en bacterias o células eucariotas.

Las moléculas MHC pueden obtenerse clonando ADNc que codifica las diferentes moléculas de interés según procedimientos estándar, por ejemplo, como se describe en Molecular Cloning (Sambrook, Fritsch y Maniatis, Cold Spring Harbor Press, 1989, ref. 13). Brevemente, se sintetiza ADNc a partir de líneas celulares apropiadas usando

kits de síntesis de ADNc comerciales (*in casu* de Pharmacia). Por ejemplo, en el caso de células humanas, las células pueden derivar del panel de líneas de células B humanas transformadas con EBV que expresan HLA de la Base de Datos de Panel de Líneas Celulares del 12 International Histocompatibility Workshop ("HLA: Genetic diversity of HLA. Functional and Medical Implication", Ed. Dominique Charron, EDK Press, 1997 (ref. 12). Por ejemplo, en el caso de HLA A*0201, una línea celular apropiada sería IHW 9012. La secuencia de nucleótidos correspondiente a una molécula MHC (HLA) deseada puede encontrarse en bases de datos disponibles públicamente. Usando la información de secuencia apropiada, pueden diseñarse cebadores oligonucleotídicos para amplificar por la reacción PCR la región codificadora que engloba la molécula MHC (HLA) madura relevante a partir del ADNc apropiado. El conjunto de cebadores directo e inverso relevante para el propósito de amplificar se inserta en los sitios de restricción NcoI y HindIII de un vector de expresión apropiado. Los vectores de expresión adecuados se pueden obtener, por ejemplo, de Novagen (Novagen, Inc, Madison, WI, EEUU).

Péptidos asociados con moléculas MHC Clase I y MHC Clase II

Los péptidos (o antígenos peptídicos) para rellenar las moléculas MHC pueden tener cualquier longitud. Los péptidos deben tener una longitud de al menos 8-10 residuos de aminoácidos cuando se asocian con moléculas MHC Clase I. La longitud de los péptidos asociados con moléculas MHC Clase II es habitualmente mayor que los péptidos asociados con moléculas MHC Clase I y puede ser, por ejemplo, tanto como 50 residuos de aminoácidos, sin embargo, habitualmente menos de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos tal como menos de aproximadamente 17 residuos de aminoácidos. Sin embargo, debe entenderse que las longitudes indicadas anteriormente son un ejemplo, y por lo tanto no deben ser limitativas.

Como se conocen moléculas o tejidos antigénicos para varias inmunopatologías, pueden seleccionarse péptidos adecuados usando esta información. Como ejemplo, se ha identificado un panel de péptidos antigénicos de antígenos asociados a tumores reconocidos por células T citotóxicas específicas.

La composición de aminoácidos también puede obtenerse por procedimientos iterativos o por modelado molecular. La identificación rápida y fiable de epítomos de células T restringidos a MHC Clase I y Clase II es esencial en varios campos de la investigación médica incluyendo la definición de nuevos antígenos tumorales, auto-antígenos o respecto a enfermedades infecciosas. Por lo tanto, un pre-requisito es el conocimiento exacto acerca de las interacciones moleculares en el complejo MHC-péptido-TCR. Mediante bibliotecas de péptidos combinatorias sintéticas se ha revelado un gran número de restos de unión a péptido de MHC en los últimos diez años. Una característica común de los restos de unión a péptido de MHC es la presencia de residuos de anclaje del péptido y bolsillos del sitio de unión, que controlan la fuerza de la unión del péptido a la molécula MHC. Se han encontrado más de 500 moléculas MHC diferentes, cada una de ellas comprendiendo diferentes restos de unión a péptido. A partir de bases de datos existentes que contienen información de restos de unión, se han desarrollado varios algoritmos para predecir restos de unión de MHC deducidos a partir de secuencias conocidas de antígenos. Un ejemplo muy conocido es la BASE DE DATOS DE LIGANDOS Y RESTOS PEPTÍDICOS MHC "SYFPEITHI", una base de datos que comprende aproximadamente 2.000 secuencias peptídicas que se sabe se unen a moléculas MHC Clase I y Clase II. Las entradas se compilan a partir de reportes publicados. Las bases de datos proporcionan una herramienta fuerte para la identificación de restos de unión a MHC en moléculas implicadas en una variedad de infecciones y transformaciones celulares. Por ejemplo, se han identificado antígenos VIH/SIV y antígenos asociados a tumores. A partir de las secuencias conocidas de estos antígenos, se han predicho varios restos de unión a MHC y posteriormente se han verificado por análisis de unión de péptido. Deducciones similares de péptidos de unión a MHC están disponibles para una variedad de antígenos asociados a enfermedad, por ejemplo, en cáncer, malaria y tuberculosis.

Las estrategias más recientes para mejorar la predicción de epítomos peptídicos MHC Clase I adecuados se basan en el conocimiento para digerir patrones de proteosomas que generan los péptidos unidos a MHC Clase I en RE. Como ejemplo, el servidor NetChop WWW produce predicciones de la red neural para sitios de escisión del proteasoma humano (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/>). Como la estructura del proteasoma está bastante conservada, es probable que el servidor sea capaz de producir predicciones fiables para al menos los demás proteosomas de mamíferos. Un servidor similar está disponible en <http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi> (véase también C. Kuttler, A.K. Nussbaum, T.P. Dick, H.-G. Rammensee, H. Schild, K.P. Haderler, An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages, J. Mol. Biol. 298 (2000), 417-429) (ref. 24).

El análisis por redes artificiales entrenadas permite la identificación de restos y características adicionales que estimulan o inhiben la escisión. Las herramientas también permiten, en combinación con un predictor de la capacidad de unión MHC, una predicción más completa de la generación y presentación de péptidos en moléculas MHC Clase I.

Los péptidos pueden obtenerse por métodos de síntesis en fase sólida. La primera etapa de la técnica introducida en primer lugar por Merrifield (refs. 14 y 15) consiste en el ensamblaje de una cadena peptídica con derivados de aminoácidos protegidos en un soporte polimérico. La segunda etapa de la técnica es la escisión del péptido del soporte con la escisión concurrente de todos los grupos protectores de cadena lateral para proporcionar el péptido libre crudo. Para conseguir péptidos más largos, estos procesos pueden repetirse secuencialmente.

Para una revisión de esta metodología, incluyendo los diferentes esquemas de protección química y soportes sólidos y solubles, véase por ejemplo, G. Barany y Fields (refs. 16 y 17).

5 Un gran número de péptidos, denominado bibliotecas peptídicas, puede obtenerse por síntesis peptídica combinatoria; véase, por ejemplo, Gordon et al., R.A. Houghten et al. y G. Jung et al. (refs. 18, 19 y 20). Estas colecciones de péptidos pueden contener aminoácidos tanto naturales como no naturales y miméticos de aminoácidos en las secuencias. Las bibliotecas son útiles para cribar un gran número de péptidos.

Otros métodos para obtener péptidos incluyen ligación enzimática de fragmentos, técnicas de ingeniería genética como, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio. Alternativamente, los péptidos pueden obtenerse después del aislamiento de fuentes naturales.

10 Producción de construcciones de moléculas MHC de la invención

Por la presente invención, es posible unir moléculas MHC solubles de baja afinidad establemente a sus contra receptores específicos. El proceso que hace esto posible se describe en lo que sigue y comprende asociar la molécula MHC a una molécula vehicular (que puede elegirse para ser soluble o no soluble, dependiendo del uso pretendido) para formar la construcción de moléculas MHC, que así es un compuesto poli-ligando (es decir, poli-valente).

15 La pluralidad de moléculas MHC de baja afinidad organizadas de esta manera como complejos moleculares multi o poli-valentes compensa las altas velocidades de disociación intrínsecas relacionadas con la unión de moléculas MHC individuales.

20 Las construcciones de moléculas MHC de la presente invención que expresan múltiples moléculas MHC de baja afinidad se unen a receptores específicos en células que reconocen MHC con alta avidéz. Por ejemplo, la forma monomérica de HLA Clase I soluble se disocia rápidamente, mientras una construcción de moléculas MHC de la invención que comprende HLA Clase I ha demostrado ser mucho más estable.

Así, la presente invención se refiere además a un proceso para preparar una construcción de moléculas MHC.

El proceso de la invención comprende las etapas de

25 (a) proporcionar una molécula MHC o una subunidad de molécula MHC, y

(b) asociar la molécula MHC o la subunidad de molécula MHC a una molécula vehicular adecuada como se describe en la presente memoria, o una molécula vehicular adecuada y una entidad de unión adecuada como se describe en la presente memoria, obteniendo de esta manera una construcción de moléculas MHC.

Como se ha mencionado, la molécula vehicular puede elegirse de manera que sea soluble o no soluble.

30 Más específicamente, el proceso de la presente invención comprende las etapas de

(a) proporcionar una célula procariota o eucariota que comprende uno o más genes que codifican moléculas MHC o subunidades de moléculas MHC etiquetadas o no etiquetadas, siendo el gen o genes expresables en dicha célula,

(b) cultivar la célula en condiciones en las que el gen se expresa,

35 (c) aislar las moléculas MHC o subunidades MHC de la célula en condiciones que permitan la purificación posterior de las moléculas MHC o subunidades de moléculas MHC generadas por la célula, y

(d) opcionalmente someter a las subunidades de moléculas MHC aisladas a un tratamiento de plegamiento antes de o durante un proceso de asociación a una molécula vehicular como se describe en la presente memoria, o una entidad de unión y una molécula vehicular como se describe en la presente memoria, obteniendo de esta manera la construcción de moléculas MHC.

40 Las moléculas MHC pueden generarse en la misma célula o en células diferentes. En el último caso, las moléculas MHC (que pueden ser muy bien dos clases diferentes de moléculas, por ejemplo, una cadena pesada de una molécula MHC Clase I y una β_2m) pueden combinarse antes de o durante del momento de asociación a la molécula vehicular (con o sin una entidad de unión).

Las células huésped que comprenden vectores de expresión apropiados pueden ser procariotas o eucariotas.

45 Se prefiere particularmente para la producción de moléculas MHC usadas en la presente memoria la expresión bacteriana versátil y altamente expresiva. Como ejemplo, una cepa de E. coli, por ejemplo, BL21 (DE3) lisiógena puede transformarse fácilmente con un vector de expresión que codifica ADNc de interés e inducir la expresión de grandes cantidades de moléculas.

50 Las células huésped que comprenden plásmidos de expresión que codifican las moléculas MHC pueden ser de origen procariota (bacterias) o de origen eucariota (células de levadura, insecto o mamífero).

Una producción bacteriana preferida es la que rinde grandes cantidades de molécula de subunidad desnaturalizada, por ejemplo, molécula de cadena pesada y β_2m . Las moléculas MHC funcionales pueden obtenerse por plegamiento in vitro según procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un método convencional describe que la molécula de cadena pesada MHC Clase I desnaturalizada y totalmente reducida obtenida de bacterias se regenera en presencia de β_2m y péptido apropiado en condiciones físicas y químicas que permiten la formación de enlaces disulfuro y el establecimiento de la formación secundaria y terciaria de cadenas polipeptídicas desnaturalizadas (ref. 21). Tanto el péptido como β_2m se añaden en exceso en comparación con la cantidad de cadena pesada a plegar para compensar las bajas afinidades de las moléculas de subunidad en las fases tempranas de plegamiento. El péptido de interés debe comprender residuos de anclaje apropiados para asegurar una carga suficiente en el sitio de unión a péptido formado por la cadena pesada.

Un método desarrollado más recientemente y preferido "Plegamiento de Proteína Oxidada" (OPF) se aprovecha de las moléculas de cadena pesada con enlaces disulfuro pre-formados, que dirigen un plegamiento rápido y más eficiente de las moléculas desnaturalizadas. Este método describe el plegamiento de cadenas pesadas MHC Clase I en presencia de β_2m solo. Una molécula MHC Clase I vacía de péptido y bioquímicamente estable se forma por asociación de cadena pesada y ligera. La adición posterior de péptidos que comprenden residuos de anclaje apropiados da lugar a la formación rápida de los complejos MHC-péptido funcionales y estables.

Las moléculas MHC o subunidades de moléculas MHC bien definidas también pueden producirse en células que codifican ADNc apropiados. Los vectores de expresión que comprenden dichos ADNc pueden introducirse en células huésped usando cualquier técnica conocida en la técnica. Estas técnicas incluyen electroporación, transfección mediada por fosfato de calcio, transferencia de ADN mediada por transferrina-policación, transfección con ácidos nucleicos desnudos o encapsulados, fusión celular mediada por liposomas, transporte intracelular de lechos de látex recubiertos con ADN, fusión de protoplastos e infección viral.

Como ejemplo, los restos de unión a péptido, que serían interesantes para estudio en conexión con la presente invención, se muestran en las Figuras 34-37.

Terapia

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere en general al campo de la terapia. Las construcciones de moléculas MHC de la invención son una herramienta potente en varias aplicaciones terapéuticas. En particular, las construcciones de moléculas MHC de la invención son aplicables en aplicaciones terapéuticas in vivo y ex vivo como será evidente a partir de lo que sigue.

La presente invención también se basa en el reconocimiento de que es posible diseñar una construcción de moléculas MHC poli-ligando de manera que (I) se tomen como diana células que reconocen MHC, y (II) se induzca una respuesta según se desee, en células que reconocen MHC diana específicas abordando receptores en dichas células. Se reconoció además que con dicho diseño de complejos molécula MHC/péptido con una especificidad dada, es posible "añadir" otros estímulos a la composición terapéutica incorporando otras moléculas, que afectarán a la actividad de las células que reconocen MHC. Así, es posible modular la actividad de clones de células que reconocen MHC que son dianas específicas, mientras que se deja sin afectar a otros clones de células que reconocen MHC. Además, también es posible modular específicamente la actividad de más de un clon de células que reconocen MHC eligiendo apropiadamente las otras moléculas mencionadas anteriormente. La invención se basa además en el reconocimiento de que es posible obtener células que reconocen MHC específicas usando las construcciones de moléculas MHC descritas en la presente memoria, para modular tal como ex vivo, mediante lo cual dichas células pueden usarse para tratamiento in vivo.

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona métodos para regular al alza, regular a la baja, modular, restaurar, aumentar, y/o estimular el sistema inmune, así como métodos para inducir anergia de células. Esto puede conseguirse según la presente invención en general de dos maneras, concretamente in vivo o ex vivo. Por "in vivo" se quiere decir que una cantidad efectiva de una sustancia o ingrediente activo se administra a un sujeto por cualquier ruta adecuada, ejerciendo su efecto la sustancia o ingrediente activo en el sujeto. Por "ex vivo" (también puede denominarse "in vitro") se quiere decir que las células extraídas de un sujeto se ven afectadas de alguna manera fuera del sujeto, y después se re-introducen en el sujeto, consiguiendo de esta manera una respuesta deseada.

Debe enfatizarse que todas y cualesquiera definiciones proporcionadas anteriormente tanto respecto a las construcciones de moléculas MHC como a otros términos se aplican igualmente a lo que sigue. Debe entenderse que las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden comprender una o más construcciones de moléculas MHC como se ha definido anteriormente. Para la definición de "una o más", así como "un", "una", "una pluralidad", y "el", véase anteriormente. Como también se ha descrito anteriormente, las moléculas MHC de la construcción pueden estar rellenas de péptido, vacías de péptido o mezclas de éstas. Las moléculas MHC de cada construcción pueden ser iguales o diferentes. Asimismo, los péptidos de las moléculas MHC pueden ser iguales o diferentes. Asimismo, la construcción de moléculas MHC pueden comprender una o más moléculas biológicamente activas, que pueden ser iguales o diferentes. Estas expresiones se describen en lo anterior.

En particular, la inclusión de moléculas biológicamente activas puede ser importante para iniciar una respuesta según se desee. Como se ha mencionado anteriormente, el sistema inmune depende de varias rutas de señalización, y así la inclusión de moléculas biológicamente activas, bien como parte de la construcción MHC o solas, puede ser una manera excelente de controlar o guiar el sistema inmune.

5 Así, la presente invención se refiere generalmente a las construcciones de moléculas MHC per se como se ha definido anteriormente para uso como composiciones terapéuticas o medicamentos. La presente invención también se refiere a las construcciones de moléculas MHC como se define en la presente memoria para uso en terapia in vivo y para uso en terapia ex vivo.

10 En un aspecto, la presente invención se refiere a composiciones terapéuticas que comprenden como un ingrediente activo una construcción de moléculas MHC como se define en la presente memoria.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones terapéuticas que comprenden como ingrediente activo una cantidad efectiva de células que reconocen MHC, pudiendo obtenerse las células que reconocen MHC por

15 la puesta en contacto de una muestra de un sujeto que comprende células que reconocen MHC con una construcción de moléculas MHC como se describe en la presente memoria, mediante lo cual las células que reconocen MHC se unen a la construcción de moléculas MHC,

el aislamiento de la construcción de moléculas MHC y las células que reconocen MHC unidas, y

la expansión de dichas células que reconocen MHC hasta un número clínicamente relevante.

Las composiciones terapéuticas pueden comprender adecuadamente uno o más adyuvantes y/o excipientes.

20 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "adyuvante" se refiere a un adyuvante inmunológico. Por esto se quiere decir un compuesto que es capaz de aumentar o facilitar la respuesta del sistema inmune al ingrediente en cuestión, induciendo de esta manera una respuesta inmune o una serie de respuestas inmunes en el sujeto. El adyuvante puede facilitar el efecto de la composición terapéutica formando depósitos (prolongando la vida media del ingrediente), proporcionar ayuda adicional de células T y estimular la producción de citoquinas. La facilitación de la supervivencia del antígeno y la estimulación inespecífica por adyuvantes puede requerirse, en algunos casos, si los epítopos de la molécula MHC son la única característica en la composición terapéutica reconocida por el sistema inmune.

25 En el término "respuesta inmune" se incluyen las respuestas inmunes humoral específica, es decir, anticuerpo, así como la celular, siendo los anticuerpos serológicos así como secretores y perteneciendo a las subclases IgM, IgD, IgG, IgA e IgE así como todos los isotipos, alotipos, y subclases de éstas. El término se pretende que incluya además otros componentes séricos o tisulares. La respuesta celular incluye linfocitos T auxiliares Tipo-1 y Tipo-2, células T citotóxicas así como células NK.

35 Los ejemplos de adyuvante adecuado son aquellos mencionados anteriormente, es decir, saponinas tales como Quil: A y Qs-21, emulsiones aceite en agua tales como MF59, MPL, PLG, PLGA, sales de aluminio, fosfato de calcio, emulsiones agua en aceite tales como IFA (adyuvante incompleto de Freund) y CFA (adyuvante completo de Freund), interleuquinas tales como IL-1 β , IL-2, IL-7, IL-12, e INF γ , Adju-Phos[®], glucano, formulación de antígeno, micropartículas biodegradables, Holotoxina del Cólera, liposomas, DDE, DHEA, DMPC, DMPG, Complejo DOC/Alúmina, ISCOMs[®], muramil dipéptido, monofosforil lípido A, muramil tripéptido, y fosfatidiletanolamina. En una realización preferida, el adyuvante se selecciona de saponinas tales como Quil A y Qs-21, MF59, MPL, PLG, PLGA, fosfato de calcio, y sales de aluminio. Los ejemplos de excipientes adecuados son aquellos mencionados anteriormente, es decir, diluyentes, tampones, agentes de suspensión, agentes humectantes, agentes solubilizantes, agentes ajustadores del pH, agentes dispersantes, agentes conservantes, y/o colorantes. En particular, puede ser adecuado un tampón PBS sin iones calcio ni iones magnesio.

45 Las composiciones terapéuticas de la invención pueden aplicarse adecuadamente en el tratamiento, prevención, estabilización, o alivio de varias enfermedades. Las enfermedades de relevancia son aquellas mencionadas anteriormente, es decir, enfermedades de origen inflamatorio, auto-inmune, alérgico, viral, canceroso, infeccioso, alo o xenogénico (injerto frente a huésped y huésped frente a injerto). En particular, la enfermedad puede ser una enfermedad inflamatoria crónica del intestino tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, esclerosis, diabetes tipo I, artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis atópica, asma, melanoma maligno, carcinoma renal, cáncer de mama, 50 cáncer de pulmón, cáncer del útero, cáncer prostático, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, linfoma cutáneo, carcinoma hepático, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, enfermedad relacionada con el rechazo, enfermedad relacionada con injerto frente a huésped, o una enfermedad viral asociada con hepatitis, SIDA, sarampión, viruela, varicela, rubéola o herpes.

Más específicamente, la enfermedad puede ser

- de origen inflamatorio/auto-inmune, incluyendo asma, neumonitis por hipersensibilidad, enfermedad pulmonar intersticial, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar intersticial asociada con enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa o enfermedad de Whipple, enfermedad pulmonar intersticial asociada con granulomatosis de Wegeners o vasculitis por hipersensibilidad,
- 5 síndromes de vasculitis, púrpura de Hennoch-Schönleins, síndrome de Goodpastures, granulomatosis de Wegeners, enfermedades renales tales como glomerulopatía mediada por anticuerpos como en glomerulonefritis aguda, nefritis asociada con lupus eritematoso sistémico, nefritis asociada con otras enfermedades sistémicas tales como granulomatosis de Wegeners y síndrome de Goodpastures y enfermedad mixta del tejido conectivo, nefritis intersticial crónica, glomerulonefritis crónica,
- 10 enfermedades gastrointestinales tales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, enfermedad de Whipple, colitis colagenosa, colitis eosinofílica, colitis linfática,
- enfermedades hepato biliares tales como hepatitis auto-inmune, hepatitis inducida por el alcohol, fibrosis periportal, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante,
- 15 enfermedades del sistema nervioso central o periférico tales como enfermedad desmielinizante como esclerosis múltiple, encefalomiелitis diseminada aguda, panencefalitis esclerosante sub-aguda,
- enfermedad de la piel tal como psoriasis, dermatitis atópica, eccema, enfermedad alérgica de la piel, esclerosis sistémica progresiva (escleroderma), dermatitis exfoliante, pénfigo vulgar,
- enfermedades de las articulaciones tales como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis asociada con psoriasis o enfermedad inflamatoria del intestino,
- 20 enfermedades músculo-esqueléticas tales como miastenia grave, polimiositis,
- enfermedades endocrinas tales como diabetes mellitus dependiente de insulina, tiroiditis auto-inmune (Hashimoto), tireotoxicosis, Graves,
- enfermedades del sistema hematopoyético tales como anemia auto-inmune, trombocitopenia auto-inmune,
- 25 enfermedades cardiovasculares tales como cardiomiopatía, vasculitis, enfermedad cardiovascular asociada con enfermedades sistémicas como lupus eritematoso sistémico, poliartritis nodosa, artritis reumatoide, escleroderma, sarcoidosis,
- enfermedades de origen canceroso, incluyendo melanoma maligno, síndrome de Sezary, linfoma de células T cutáneo, carcinoma de células renales, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer del útero, cáncer prostático, carcinoma hepático, cáncer de pulmón, y sarcoma,
- 30 enfermedades, trastornos o afecciones de origen alérgico.

Los alérgenos más comunes, frente a los que se producen reacciones alérgicas, incluyen inhalación de alérgenos que se originan entre otros de árboles, gramas, hierbas, hongos, ácaros domésticos, ácaros de almacenamiento, cucarachas y pelo animal, plumas, y caspa. Los alérgenos de polen importantes de árboles, gramas y hierbas son los que se originan de los órdenes taxonómicos de *Fagales*, *Oleales* y *Pinales* incluyendo entre otros abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), el orden de *Poales* incluyendo entre otros gramas de los géneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis* y *Secale*, los órdenes de *Asterales* y *Urticales* incluyendo entre otros hierbas de los géneros *Ambrosia* y *Artemisia*. Los alérgenos de inhalación importantes de hongos son entre otros los que se originan de los géneros *Alternaria* y *Cladosporium*. Otros alérgenos de inhalación importantes son los de ácaros domésticos del género *Dermatophagoides*, ácaros de almacenamiento del género *Lepidoglyphys destructor*, los de cucarachas y los de mamíferos tales como gato, perro, caballo, vaca, y pájaro. También, se observan comúnmente reacciones alérgicas frente a insectos picadores o chupadores tales como los del orden taxonómico de Hymenoptera incluyendo abejas, avispas, y hormigas. Los componentes alérgenos específicos son conocidos por el experto en la técnica e incluyen *Bet v 1* (*B. verrucosa*, abedul), *Aln g 1* (*Alnus glutinosa*, aliso), *Cor a 1* (*Corylus avelana*, avellano) y *Car b 1* (*Carpinus betulus*, carpe) del orden *Fagales*. Otros son *Cry j 1* (*Pinales*), *Amb a 1 y 2*, *Art v 1* (*Asferales*), *Par j 1* (*Urticales*), *Ole a 1* (*Oleales*), *Ave a 1*, *Cyn d 1*, *Dac g 1*, *Fes p 1*, *Hol l 1*, *Lol p 1 y 5*, *Pas n 1*, *Phl p 1 y 5*, *Poa p 1, 2 y 5*, *Sec c 1 y 5*, y *Sor h 1* (varios pólenes de grama), *Alt a 1 y Cla h 1* (hongos), *Der f 1 y 2*, *Der p 1 y 2* (ácaros domésticos, *D. farinae* y *D. pteronyssinus*, respectivamente), *Lep d 1*, *Bla g 1 y 2*, *Per a 1* (cucarachas, *Blatella germanica* y *Periplaneta americana*, respectivamente), *Fel d 1* (gato), *Can f 1* (perro), *Equ c 1, 2 y 3* (caballo), *Apis m 1 y 2* (abeja de la miel), *Ves g 1, 2 y 5*, *Pol a 1, 2 y 5* (todas las avispas) y *Sol i 1, 2, 3 y 4* (hormiga de fuego), por mencionar los más comunes.

50

Las composiciones terapéuticas de la invención pueden formularse de cualquier manera adecuada, entre otros dependiendo de la ruta de administración, y la cantidad de ingrediente activo que se va a administrar. En particular,

las composiciones terapéuticas de la invención pueden formularse para administración parenteral, incluyendo administración intravenosa, intramuscular, intraarticular, subcutánea, intradérmica, epicutánea/transdérmica, e intraperitoneal, para infusión, para administración oral, para administración nasal, para administración rectal, o para administración tópica.

5 La construcción de moléculas MHC puede inmovilizarse adecuadamente en un soporte sólido o semi-sólido. Los ejemplos de soporte sólido o semi-sólido son aquellos mencionados anteriormente, es decir, partículas, lechos, partículas biodegradables, láminas, geles, filtros, membranas, fibras, capilares, agujas, tiras de microtitulación, tubos, placas o pocillos, peines, puntas de pipeta, micromatrices, y chips. En particular, el soporte sólido puede seleccionarse de partículas y lechos, preferiblemente partículas y lechos, que son poliméricos, magnéticos o superparamagnéticos. Para terapia in vivo, se preferirán especialmente las partículas biodegradables, mientras que para terapia ex vivo, se preferirán especialmente las partículas biodegradables, poliméricas, magnéticas, paramagnéticas o superparamagnéticas.

10 Como se ha mencionado, las construcciones de moléculas MHC usadas en las composiciones terapéuticas son compuestos de molécula poli-ligando muy interesantes que poseen propiedades altamente apropiadas para la modulación de células que reconocen MHC tanto in vivo como ex vivo.

15 Las construcción de moléculas MHC poli-ligando, debido a la molécula vehicular, pueden cargarse con una pluralidad de moléculas MHC que presentan péptido para asegurar una unión de alta avidéz a contra receptores específicos.

20 Debe entenderse que dichas respuestas incluyen la inducción de anergia que da lugar a apoptosis, regulación al alza de una respuesta, regulación a la baja de una respuesta, estimulación de una respuesta, modulación de una respuesta, aumento de una respuesta, inhibición de una respuesta, y manipular de cualquier otra manera una respuesta. A este respecto, debe entenderse que las moléculas MHC/péptidos de la construcción pueden elegirse de manera que se induzcan varias otras respuestas, o se activen rutas de señalización que resultan en la producción de varias sustancias de señalización que pueden tener una influencia beneficiosa en la enfermedad que se va a tratar, prevenir o aliviar.

25 Para conseguir esto, la construcción de moléculas MHC usada en la composición puede comprender adecuadamente moléculas MHC heterogéneas u homogéneas (por ejemplo, que presentan diferentes péptidos) para incitar una o más funciones en las células que reconocen MHC diana in vivo y ex vivo.

30 Además, este efecto deseado de la construcción de moléculas MHC puede aumentarse, reducirse, inhibirse, estimularse o combinarse con otros efectos por la unión adicional de compuestos biológicamente activos como se ha descrito anteriormente, abordando de esta manera clones de células que reconocen MHC específicos. Para esto, puede seleccionarse una combinación específica de molécula MHC y péptido. Como ejemplo, la carga de moléculas co-estimuladoras, por ejemplo, B7.1, en una construcción de moléculas MHC poli-ligando da lugar así a la formación de una construcción de moléculas MHC poli-ligando bifuncional, que (I) está dirigida a los clones de células que reconocen MHC específicos de péptido de interés y (II) facilita la estimulación apropiada que implica dos señales obligatorias para iniciar una respuesta inmune. Otro ejemplo, es composiciones para el tratamiento de enfermedades auto-inmunes en las que una toxina recombinante, por ejemplo, PE-38, también se une a las construcciones de moléculas MHC usadas.

35 Mediante esto, es posible modular la respuesta de cualquier manera que se desee. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un método para diseñar una combinación molécula MHC/péptido, que resulta en una respuesta deseada de la célula diana tanto in vivo como ex vivo.

40 Una variedad de enfermedades, incluyendo cáncer, causa inmunosupresión en los pacientes. La inmunoterapia es un intento de estimular el propio sistema inmune del paciente para reconocer y destruir las células cancerosas. El tumor puede ejercer su influencia supresora sobre el sistema inmune a través de varios mecanismos diferentes. Aunque las células tumorales pueden cebar el sistema inmune, los mecanismos de escape del tumor pueden inducir tolerancia inmunológica al tumor. Hay varios mecanismos conocidos por los que el tumor escapa de la vigilancia inmune. Por ejemplo, las células tumorales son frecuentemente ineficientes para presentar antígenos tumorales a las células T efectoras. Esto puede ser el resultado de la regulación a la baja o mutación en células tumorales de moléculas MHC, o regulación a la baja de moléculas co-estimuladoras tales como B7, u otras moléculas, tales como TAP, que con importantes en la ruta de presentación de antígenos.

45 Además, se ha mostrado que las células tumorales inducen tolerancia en células T mediante la regulación a la baja de la expresión de la cadena zeta de CD3 en las células T. Las células tumorales también suprimen la activación de las células T por la liberación de citoquinas inhibitorias, e inducen la apoptosis de las células T mediante la interacción Fas-ligando Fas. Las células tumorales también tienen la capacidad de suprimir el sistema inmune mediante la liberación de citoquinas tales como IL-12 que inhibe la maduración de las células dendríticas inmaduras en células presentadoras de antígeno totalmente maduras. Se ha mostrado que los factores inhibidores liberados por las células tumorales suprimen la activación de granulocitos, evitando así la muerte de las células tumorales por granulocitos activados.

Los regímenes de tratamiento comunes tales como quimioterapia y terapia con radiación también suprimen la inmunidad de una manera más general.

- 5 Se ha empleado una variedad de diferentes estrategias de la técnica anterior en un intento para restaurar o aumentar la respuesta inmune del paciente a tumores, incluyendo el tratamiento con anticuerpos monoclonales, vacunas de cáncer, terapia con citoquinas e inmunoterapia celular adoptiva usando células dendríticas o células T. La inmunoterapia celular que implica células T incluye células efectoras citotóxicas CD8+ que tienen la capacidad de matar células tumorales. Además, se ha mostrado que las células T productoras de citoquinas CD4+ también juegan un papel importante en el mantenimiento de una actividad celular anti-tumoral sostenible de las células CD8 citotóxicas. Sin embargo, el éxito de los métodos de la técnica anterior ha sido limitado.
- 10 Según lo anterior, las construcciones de moléculas MHC interesantes de la composición terapéutica pueden ser aquellas,
- en las que al menos dos de las moléculas MHC de la construcción de moléculas MHC usada son diferentes,
- en las que las moléculas MHC de la construcción de moléculas MHC usada son iguales,
- 15 en las que al menos dos de los péptidos portados por una pluralidad de moléculas MHC de la construcción de moléculas MHC usada son diferentes,
- en las que los péptidos portados por las moléculas MHC de la construcción de moléculas MHC usada son iguales,
- en las que los péptidos portados por las moléculas MHC de la construcción de moléculas MHC usada se modifican químicamente o se sintetizan para contener aminoácidos no naturales, grupos hidrofílicos o hidrofóbicos,
- 20 en las que los péptidos portados por las moléculas MHC Clase I de la construcción de moléculas MHC usada están unidos a la cadena pesada MHC Clase I por un conector flexible,
- en las que los péptidos portados por las moléculas MHC Clase I de la construcción de moléculas MHC usada están unidos a la cadena ligera MHC Clase I (β_2m) por un conector flexible,
- en las que los péptidos están portados por moléculas MHC Clase I de la construcción de moléculas MHC usada que comprenden cadena pesada MHC Clase I en asociación con una cadena ligera MHC (β_2m) por un conector flexible,
- 25 en las que el péptido portado por las moléculas MHC Clase II de la construcción de moléculas MHC usada está unido a la cadena alfa por un conector flexible,
- en las que el péptido portado por las moléculas MHC Clase II de la construcción de moléculas MHC usada está unido a la cadena β por un conector flexible,
- en las que las moléculas MHC Clase I de la construcción de moléculas MHC usada están mutadas,
- 30 en las que las moléculas MHC Clase II de la construcción de moléculas MHC usada están mutadas,
- en las que las moléculas MHC de la construcción de moléculas MHC usada son moléculas MHC que carecen de péptido.
- 35 Como se ha mencionado anteriormente, la construcción de moléculas MHC puede comprender una o más moléculas biológicamente activas. Éstas se han definido anteriormente. Los compuestos biológicamente activos particularmente preferidos se seleccionarán de MIC A, MIC B, CD1d, ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD9, CD27, CD28, CD30, CD69, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD147, CDw150 (SLAM), CD152 (CTLA-4), CD153 (CD30L), CD40L (CD154), NKG2D, ICOS, HVEM, HLA Clase II, PD-1, Fas (CD95), FasL, CD40, CD48, CD58, CD70, CD72, B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), B7RP-1, B7-H3, PD-L1, PD-L2, CD134L, CD137L, ICOSL, LIGHT, CD16, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80, 2B4, KIR, LIR, CD94/NKG2A, y CD94/NKG2C.
- 40 Como se ha mencionado, la presente invención se refiere a métodos para el tratamiento de un animal, incluyendo un ser humano, métodos que comprenden administrar una composición terapéutica como se describe en la presente memoria en una cantidad efectiva. El tratamiento puede ser tal que implique la regulación al alza, regulación a la baja, modulación, estimulación, inhibición, restauración, aumento y/o de otra manera manipulación de las respuestas inmunes. Esto puede conseguirse de hecho por las composiciones de la presente invención. La presente invención
- 45 también se refiere a métodos para inducir anergia en una célula, métodos mediante los cuales se administra una composición terapéutica como se describe en la presente memoria.
- En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a métodos para llevar a cabo inmunoterapia adoptiva, métodos que comprenden administrar a un animal, incluyendo un ser humano, una composición terapéutica como se describe en la presente memoria.

Terapia in vivo

Como se ha mencionado anteriormente, la composición terapéutica de la invención es adecuada para terapia in vivo.

5 Las composiciones terapéuticas para terapia in vivo pueden comprender adecuadamente de 1 a 10 construcciones de moléculas MHC diferentes. Así, se contempla la inclusión de dos, tres, cuatro, cinco, seis o más construcciones de moléculas MHC diferentes y se cree que es ventajoso en algunos casos. También, puede ser ventajoso incluir una construcción de moléculas MHC que porta moléculas MHC que portan diferentes péptidos. La cantidad de cada construcción de moléculas MHC depende de la construcción de moléculas MHC o combinación de construcciones de moléculas MHC en cuestión. Además, la afinidad de la molécula MHC debe considerarse. Los péptidos de alta afinidad, así como baja afinidad pueden portarse por las moléculas MHC. Esto, sin embargo, se espera que afecte la cantidad necesaria para generar la respuesta deseada y la fuerza de la respuesta deseada. Se contempla que la cantidad de construcción de moléculas MHC requerida para inducir una respuesta inmune sistémica estará típicamente en el intervalo de 0,0001 a 10.000 µg/kg/dosis, tal como de 0,01 a 1.000 µg/kg/dosis, de 0,1 a 100 µg/kg/dosis, o de 1 a 10 µg/kg/dosis. En general, las moléculas MHC usadas deben ser singénicas con el sujeto receptor para evitar o minimizar el riesgo de aloracciones.

15 La administración de la composición de la invención puede ser como dosis únicas o como varias dosis. En determinados casos, la administración sólo una vez puede ser suficiente. En general, deben proporcionarse varias dosis con intervalos de un día, una semana, dos semanas, un mes, o varios meses, etc. Por ejemplo, una dosis única puede proporcionarse una vez, o una dosis puede proporcionarse como un cebador, seguido de una o más administraciones, o un régimen de administración continua como hasta cuatro dosis por semana, seguido de un mes sin administraciones, seguido de hasta cuatro dosis por semana (opcionalmente con cantidad creciente de la construcción de moléculas MHC), etc. Opcionalmente pueden usarse diferentes adyuvantes o combinaciones de adyuvantes en las diferentes administraciones. Éstos son todos ejemplos, y el régimen de administración óptimo depende de la construcción de moléculas MHC en cuestión y de varios otros factores. El experto en la técnica sabrá fácilmente cómo optimizar esto.

25 Por supuesto, pueden administrarse otros medicamentos simultáneamente con el fin de aumentar o apoyar el tratamiento.

30 En particular, una o más construcciones de moléculas MHC sin moléculas MHC unidas, pero con moléculas biológicamente activas unidas puede administrarse junto con la construcción de moléculas MHC para estimular, regular al alza, regular a la baja, inhibir o aumentar otros clones de células que reconocen MHC además de los clones de células que reconocen MHC abordados por la construcción de moléculas MHC de la composición. Éstas también pueden añadirse para estimular una respuesta al clon celular abordado. En particular, dichas moléculas biológicamente activas pueden formar parte de la construcción de moléculas MHC como se ha descrito en lo anterior.

35 Los contenedores para mezclar y almacenar la composición terapéutica de la invención pueden ser de vidrio o de varios materiales poliméricos. Los contenedores elegidos no deben adsorber el producto almacenado. Los contenedores pueden ser adecuadamente ampollas o viales tapados para mono o multidosisación.

La invención se refiere además a métodos para producir las composiciones terapéuticas de la invención, métodos que comprenden

proporcionar una construcción de moléculas MHC como se describe en la presente memoria, y

40 solubilizar o dispersar la construcción de moléculas MHC en un medio adecuado para sustancias terapéuticas, y opcionalmente añadir otros adyuvantes y/o excipientes.

Terapia ex vivo

Como se ha mencionado anteriormente, las composiciones de la presente invención son adecuadas para terapia ex vivo.

45 Así, la presente invención se refiere en particular a composiciones terapéuticas que comprenden como un ingrediente activo una cantidad efectiva de células que reconocen MHC, obteniéndose las células que reconocen MHC por

aislamiento de un sujeto de células que reconocen MHC usando una construcción de moléculas MHC como se define en la presente memoria, y

50 expansión de dichas células que reconocen MHC hasta un número clínicamente relevante.

Una vez se han aislado las células que reconocen MHC, si se necesita, pueden modificarse o manipularse genéticamente o de cualquier otra manera apropiada antes de expandirlas.

Las células que reconocen MHC pueden aislarse de varias maneras, que se describen con más detalle en lo que sigue.

En particular:

- 5 1) Una o más construcciones de moléculas MHC como se define en la presente memoria pueden ponerse en contacto con una muestra de un sujeto, mediante lo cual se permite que las construcciones de moléculas MHC se unan a las células que reconocen MHC en la muestra. Las construcciones de moléculas MHC pueden recuperarse de la muestra, posteriormente a esto las células que reconocen MHC pueden liberarse de las construcciones de moléculas MHC y posteriormente expandirse.
- 10 2) Una o más construcciones de moléculas MHC como se define en la presente memoria pueden ponerse en contacto con una muestra de un sujeto, mediante lo cual se permite que las construcciones de moléculas MHC se unan a las células que reconocen MHC en la muestra. Las construcciones de moléculas MHC pueden recuperarse de la muestra, posteriormente a esto las células que reconocen MHC pueden liberarse de la construcción de moléculas MHC y posteriormente expandirse en presencia de una o más otras construcciones de moléculas MHC.
- 15 3) Una o más construcciones de moléculas MHC como se define en la presente memoria inmovilizadas en un soporte sólido o semi-sólido como se define en la presente memoria pueden ponerse en contacto con una muestra de un sujeto, mediante lo cual se permite que las construcciones de moléculas MHC se unan a las células que reconocen MHC en la muestra. Las construcciones de moléculas MHC pueden recuperarse de la muestra, posteriormente a esto las células que reconocen MHC pueden liberarse de las construcciones de moléculas MHC y posteriormente expandirse.
- 20 4) Una o más construcciones de moléculas MHC como se define en la presente memoria inmovilizadas en un soporte sólido o semi-sólido como se define en la presente memoria pueden ponerse en contacto con una muestra de un sujeto, mediante lo cual se permite que las construcciones de moléculas MHC se unan a las células que reconocen MHC en la muestra. Las construcciones de moléculas MHC pueden recuperarse de la muestra, posteriormente a esto las células que reconocen MHC pueden liberarse de las construcciones de moléculas MHC y posteriormente expandirse en presencia de una o más otras construcciones de moléculas MHC.
- 25 5) Una o más construcciones de moléculas MHC marcadas como se define en la presente memoria inmovilizadas en un soporte sólido o semi-sólido como se define en la presente memoria pueden ponerse en contacto con una muestra de un sujeto, mediante lo cual se permite que las construcciones de moléculas MHC se unan a las células que reconocen MHC en la muestra. Las construcciones de moléculas MHC pueden recuperarse de la muestra, posteriormente a esto las células que reconocen MHC pueden liberarse de las construcciones de moléculas MHC y posteriormente expandirse.
- 30 6) Una o más construcciones de moléculas MHC marcadas como se define en la presente memoria inmovilizadas en un soporte sólido o semi-sólido como se define en la presente memoria pueden ponerse en contacto con una muestra de un sujeto, mediante lo cual se permite que las construcciones de moléculas MHC se unan a las células que reconocen MHC en la muestra. Las construcciones de moléculas MHC pueden recuperarse de la muestra, posteriormente a esto las células que reconocen MHC pueden liberarse de las construcciones de moléculas MHC y posteriormente expandirse en presencia de una o más otras construcciones de moléculas MHC.
- 35 7) Una o más construcciones de moléculas MHC como se define en la presente memoria pueden ponerse en contacto con una muestra de un sujeto, mediante lo cual se permite que las construcciones de moléculas MHC se unan a las células que reconocen MHC en la muestra. Después, la muestra que contiene las construcciones de moléculas MHC unidas a las células que reconocen MHC pueden ponerse en contacto con un soporte sólido o semi-sólido como se define en la presente memoria que tiene inmovilizado en él una o más moléculas que son capaces de unirse a cualquier parte de las células que reconocen MHC o construcción de moléculas MHC, mediante lo cual la construcción de moléculas MHC con las células que reconocen MHC unidas se unirá al soporte. Las construcciones de moléculas MHC así unidas con las células que reconocen MHC pueden recuperarse de la muestra, posteriormente a esto las células que reconocen MHC pueden liberarse de las construcciones de moléculas MHC y posteriormente expandirse.
- 40 8) Una o más construcciones de moléculas MHC marcadas como se define en la presente memoria pueden ponerse en contacto con una muestra de un sujeto, mediante lo cual se permite que las construcciones de moléculas MHC se unan a las células que reconocen MHC en la muestra. Después, la muestra que contiene las construcciones de moléculas MHC unidas a las células que reconocen MHC pueden ponerse en contacto con un soporte sólido o semi-sólido como se define en la presente memoria que tiene inmovilizado en él una o más moléculas que son capaces de unirse a cualquier parte de las células que reconocen MHC o construcción de moléculas MHC, mediante lo cual la construcción de moléculas MHC con las células que reconocen MHC unidas se unirá al soporte. Las construcciones de moléculas MHC así unidas con las células que reconocen MHC pueden recuperarse de la muestra, posteriormente a esto las células que reconocen MHC pueden liberarse de las construcciones de moléculas MHC y posteriormente expandirse en presencia de una o más otras construcciones de moléculas MHC.
- 45 55

La lista anterior no es exhaustiva de ninguna manera.

5 Debe entenderse que el tiempo de contacto entre las construcciones de moléculas MHC y la muestra dependerá de varios factores, entre otros las construcciones de moléculas MHC en cuestión y las condiciones en las cuales tiene lugar el contacto. El tiempo del contacto será cualquiera que sea suficiente para permitir la unión de las células que reconocen MHC a la construcción de moléculas MHC. El experto en la técnica sabrá fácilmente cómo optimizar esto. En general, la muestra y la construcción de moléculas MHC pueden ponerse en contacto durante 10 minutos a 2 horas, tal como de 20-45 minutos, a una temperatura de 4^oC a 20^oC.

Debe entenderse que las células que reconocen MHC son las indicadas anteriormente.

10 Debe entenderse que "muestra" tiene el significado definido anteriormente. En particular, la muestra puede ser células mononucleares de sangre periférica (PBMC) u otras preparaciones derivadas de la sangre tales como productos de leucoféresis, o médula ósea, bazo o cordón umbilical. Las muestras pueden usarse tal cual, o pueden someterse a varios métodos de purificación, descontaminación, filtración, o concentración, y/o métodos para aislar o eliminar partes de la muestra como separación inmunomagnética.

15 La construcción de moléculas MHC con células que reconocen MHC unidas pueden aislarse adecuadamente por el uso de un campo magnético (si el soporte son partículas o lechos magnéticos) (es decir, una técnica de separación inmunomagnética), o por el uso de un dispositivo de separación de células tal como un citómetro de flujo. Para el último procedimiento de aislamiento, las construcciones de moléculas MHC pueden adecuadamente estar marcadas. Si la inmovilización al soporte sólido o semi-sólido se lleva a cabo después del contacto entre la construcción de moléculas MHC y la muestra, debe entenderse que la construcción de moléculas MHC con las células que reconocen MHC puede inmovilizarse usando un compuesto capaz de unirse a ellas. Aquellos que son adecuados se indican anteriormente. Para el aislamiento inmunomagnético de células que reconocen MHC de volúmenes de muestra mayores, pueden aplicarse bolsas de sangre desechables. Los ejemplos de equipamiento adecuado para dicho propósito son el equipo Isolex® 300i o MaxSep® de Baxter Healthcare Corp, o el CliniMACS de Miltenyi Biotech.

25 Las células que reconocen MHC pueden liberarse de la construcción de moléculas MHC por procedimientos tales como ADN-conector digerido por ADNasa, conector elastina sensible a la temperatura, como se describe en WO 99/11661 (ref. 29), anticuerpos de despegado como se describe en WO 91/15766 (ref. 30), liberación por incubación y otros mecanismos de liberación conocidos para los expertos en la técnica.

30 La construcción de moléculas MHC puede comprender, según las definiciones anteriores, una o más moléculas biológicamente activas. Éstas pueden incluirse, por ejemplo, con el fin de atraer las células que reconocen MHC deseadas, y para disminuir o prevenir la inducción potencial de apoptosis que resulta del procedimiento de aislamiento.

35 Debe entenderse que la expansión de las células puede realizarse en presencia de una o más construcciones de moléculas MHC como se ha definido anteriormente. Dichas construcciones de moléculas MHC usadas pueden ser iguales a las usadas para capturar las células que reconocen MHC o pueden ser diferentes. Éstas pueden comprender, según las definiciones anteriores, una o más moléculas biológicamente activas. Dichas moléculas biológicamente activas facilitarán además múltiples interacciones con el TCR y moléculas co-estimuladoras en células que reconocen MHC y producirán la estimulación eficiente ex vivo de las células que reconocen MHC. La afinidad de unión, por ejemplo, de moléculas co-estimuladoras y sus ligandos está en el mismo intervalo que la afinidad de unión de los complejos molécula MHC-péptido y el TCR (intervalo 10 µM). La inclusión de dichas moléculas biológicamente activas facilita el uso de moléculas naturales como un reemplazo para anticuerpos estimuladores durante la expansión, ya que compensan la baja afinidad mediante la introducción de múltiples interacciones de unión. En particular, las células que reconocen MHC pueden expandirse en presencia de una o más construcciones de moléculas MHC sin moléculas MHC unidas, pero con moléculas biológicamente activas unidas para estimular, regular al alza, regular a la baja, inhibir o aumentar 1) otros clones de células que reconocen MHC aparte de los clones de células que reconocen MHC de interés así como 2) los clones de células que reconocen MHC de interés. La expansión puede realizarse además en presencia de células alimentadoras tales como células dendríticas o células del estroma.

50 Debe entenderse que la expansión de las células puede realizarse adicionalmente en presencia de compuestos adicionales, por ejemplo, los que promueven o estimulan la expansión de las células, inhiben el crecimiento de células no relevantes, o seleccionan las células deseadas. Éstos pueden ser, por ejemplo, una o más moléculas biológicamente activas como se ha descrito anteriormente. Dichos compuestos adicionales también pueden seleccionarse de citoquinas tales como linfoquinas, interferones, interleuquinas, factores de crecimiento y factores estimuladores de colonias. Por ejemplo, puede añadirse IL-2 para aumentar la proliferación de las células, y pueden añadirse otras citoquinas para inducir patrones de diferenciación particulares., si se requiere. Por ejemplo, IL-4 desencadena la diferenciación de poblaciones de células T en la subpoblación Th2, e IFN-gamma desencadena la diferenciación en la subpoblación Th1. Por supuesto, tiene que usarse un medio de cultivo adecuado y condiciones adecuadas para expandir y mantener las células. El tiempo de expansión es habitualmente entre 3 y 10 días, pero

puede ser tan largo como 14 a 20 días, o incluso más largo siempre que se mantengan la viabilidad y proliferación continuada de las células.

En un aspecto especial, la presente invención se refiere a métodos para obtener células que reconocen MHC que comprenden, métodos que comprenden

5 poner en contacto una construcción de moléculas MHC como se describe en la presente memoria y una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC en condiciones mediante las que las células que reconocen MHC se unen a la construcción de moléculas MHC, y aislar la construcción de moléculas MHC y las células que reconocen MHC unidas.

10 Dichos métodos son adecuados, por ejemplo, para la obtención de las células que reconocen MHC de composiciones terapéuticas de la invención. Además, se cree que dichos métodos son valiosos para identificar nuevos péptidos asociados con enfermedades, ya que péptidos al azar pueden aplicarse como parte de la construcción de moléculas MHC, y puede ensayarse su efecto de unión a las células que reconocen MHC. Los métodos pueden realizarse adecuadamente por técnicas de separación inmunomagnética o por citometría de flujo.

15 La invención se refiere además a métodos para producir las composiciones terapéuticas de la invención, métodos que comprenden

obtener células que reconocen MHC usando una construcción de moléculas MHC como se describe en la presente memoria,

expandir dichas células que reconocen MHC hasta un número clínicamente relevante,

formular las células obtenidas en un medio adecuado para administración, y

20 opcionalmente añadir adyuvantes y/o excipientes.

La invención se refiere además a kits para obtener las células que reconocen MHC. En una realización, dichos kits comprenden una o más construcciones de proteínas MHC como se define en la presente memoria, opcionalmente inmovilizadas en un soporte sólido o semi-sólido como se define en la presente memoria. En otra realización, dichos kits comprenden una o más construcciones de proteínas MHC como se define en la presente memoria y medios para la inmovilización de la o las construcciones de moléculas MHC antes de o después de la unión a las células que reconocen MHC.

25 La invención se refiere además en general al uso de la construcción de moléculas MHC descrita en la presente memoria para la expansión ex vivo de células que reconocen MHC. Para dicha expansión de las células ex vivo, la construcción de moléculas MHC puede proporcionarse en forma soluble. La construcción de moléculas MHC también puede proporcionarse inmovilizada en un soporte sólido o semi-sólido. Los soportes sólidos o semi-sólidos son aquellos mencionados anteriormente. Se prefieren especialmente los lechos y partículas, en particular partículas o lechos poliméricos, magnéticos o superparamagnéticos. En particular, la construcción de moléculas MHC puede comprender uno o más de los compuestos biológicamente activos como se ha descrito anteriormente.

30 En lo que sigue, se describen procedimientos más específicos en el contexto de las enfermedades cancerosas, pero los procedimientos se aplican igual de bien a otras enfermedades.

35 Se cree que una estrategia para superar el efecto supresor de, por ejemplo, células tumorales en el sistema inmune sería eliminar las células inmunes relevantes de un sujeto mediante procedimientos de aféresis estándar, y expandir y modificar estas células inmunes ex vivo antes de re-infusión en los pacientes. Esto no sólo eliminaría la presión supresora de las células tumorales, sino que también permite el rescate de células inmunocompetentes antes de los regímenes de tratamiento inmunosupresores incluyendo quimioterapia y terapia de radiación.

40 Las células T de sangre periférica pueden eliminarse de un sujeto, y ponerse en cultivo en condiciones que permitan a las células T proliferar. Dichas condiciones incluyen crecer células T con mitógenos o antígenos en presencia de citoquinas (IL-2) y células dendríticas como células presentadoras de antígeno. El antígeno puede introducirse en los cultivos bien como extractos de proteínas de tumores, antígenos proteicos o péptidos definidos, o como ARNm o ADN tumoral transfectado en las células dendríticas. Alternativamente, se han desarrollado protocolos de expansión de células T que incluyen el uso de anticuerpos estimuladores tales como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, bien en forma soluble o acoplados a una fase sólida. La ventaja de dichos protocolos de expansión basados en anticuerpo es que evitan la necesidad de células alimentadoras y antígenos tumorales que pueden no estar fácilmente disponibles. Después de la expansión de células T ex vivo, frecuentemente en el orden de 100-1.000 veces, las células T se re-infunden en los pacientes con el fin de restaurar o aumentar la función inmune frente al tumor.

45 Es muy conocido que las células T del sistema inmune expresan una multitud de especificidades, y sólo un número limitado de los clones de células T disponibles expresan especificidades que son relevantes para el reconocimiento y muerte de las células tumorales.

La mayor parte de los protocolos de la técnica anterior para la expansión de células T no tienen en cuenta la especificidad de antígeno de las células T para antígenos tumorales, y resultan en una expansión policlonal de células T que incluye una multitud de especificidades de células T irrelevantes. Aunque las células T expandidas ayudarían a restaurar la función inmune de los pacientes mediante la producción de citoquinas, se espera que sólo una fracción de las células T re-infundidas pueda reconocer y matar a las células tumorales directamente. Además, la expansión policlonal de células T incrementa el riesgo de expandir clones de células T con especificidades autoinmunes.

La presente invención se refiere en particular a inmunoterapia adoptiva usando células T con especificidades conocidas para antígenos tumorales. En este aspecto de inmunoterapia, las células T CD4 y CD8 específicas para antígenos tumorales pre-determinados pueden aislarse de sangre periférica, productos de aféresis, médula ósea, nódulos linfáticos, tumores primarios, metástasis orgánicas secundarias y otros tejidos por un procedimiento de separación inmunomagnética o por un procedimiento de citometría de flujo. Después de la purificación opcional, las células pueden expandirse ex vivo y re-infundirse en los pacientes. Dichas células T específicas de antígeno expandidas tendrán la capacidad de tomar como diana células tumorales directamente, y así serán más eficientes que las células T expandidas policlonalmente. Además, el uso de células T específicas de antígeno disminuirá el peligro potencial de re-infundir clones de células T con especificidades autoinmunes.

Por la presente invención, puede aplicarse un soporte como se ha definido anteriormente, preferiblemente en la forma de lechos o partículas como se ha definido anteriormente, que tiene construcciones de moléculas MHC como se ha definido en la presente memoria inmovilizadas en él, para ayudar en la manipulación y separación de células relevantes de una muestra. Así, un soporte que comprende partículas magnéticas puede retirarse fácilmente por agregación magnética, lo que proporciona una manera rápida, simple y eficiente de separar ex vivo células unidas.

Las partículas o lechos magnéticos con las células T específicas unidas pueden retirarse ex vivo de una muestra en un soporte sólido o semi-sólido adecuado por la aplicación de un campo magnético, por ejemplo, usando un imán permanente. Habitualmente, es suficiente aplicar un imán en el lado del recipiente que contiene la mezcla de muestra para agregar las partículas en la pared del recipiente y retirar por vertido el resto de la muestra.

Se prefieren especialmente las partículas superparamagnéticas, ya que puede evitarse la agregación magnética y aglutinación de las partículas durante la reacción. Dynabeads[®] (Dynal Biotech ASA, Oslo, Noruega) son un ejemplo particularmente adecuado.

En una realización conveniente, las construcciones de moléculas MHC pueden unirse al soporte, antes del contacto con la muestra. Dicha unión puede conseguirse fácilmente por métodos (por ejemplo, químicas de acoplamiento) muy conocidos en la técnica, y convenientemente las construcciones de moléculas MHC se unen directamente al soporte sólido, por ejemplo, por recubrimiento. Sin embargo, las construcciones de moléculas MHC también pueden unirse mediante un espaciador, un conector, o un anticuerpo como se ha descrito anteriormente. Las construcciones de moléculas MHC pueden unirse covalentemente o reversiblemente según la elección.

Alternativamente, como se ha mencionado anteriormente, las construcciones de moléculas MHC pueden ponerse en contacto en primer lugar con la muestra, para unirse a las células T antes de unirse al soporte sólido. En este caso, el soporte sólido puede portar o se le puede proporcionar convenientemente una molécula como se ha descrito anteriormente capaz de unirse a la construcción de moléculas MHC capturando de esta manera la construcción de moléculas MHC. Los ejemplos no limitativos incluyen anticuerpos frente a la entidad de unión, anticuerpos frente a la molécula vehicular, estreptavidina o derivados de ésta para uso con moléculas vehiculares biotiniladas, y anticuerpos anti-leucocito.

Cuando se usa más de un tipo de construcción de moléculas MHC pueden unirse al mismo o diferentes soportes sólidos. Dicho sistema que usa diferentes soportes sólidos es aplicable particularmente en el caso de un soporte particulado tal como lechos o partículas. Así, pueden unirse diferentes construcciones de moléculas MHC a diferentes lechos o partículas. Dichos lechos o partículas pueden tener adecuadamente diferentes tamaños o propiedades, lo que permite así la separación según las diferentes construcciones de moléculas MHC.

En una realización en la que se usa más de un tipo diferente de construcción de moléculas MHC, las cantidades o proporciones apropiadas a las que los diferentes tipos de construcciones de moléculas MHC pueden usarse las determinará fácilmente un experto en la técnica.

Como se ha mencionado anteriormente, las técnicas de separación de células basadas en unión de afinidad en fase sólida (por ejemplo, separación inmunomagnética (IMS)) son muy conocidas en la técnica y las condiciones para conseguir esto pueden ser fácilmente determinadas por el experto en este campo. Así, por ejemplo, un soporte sólido que porta anticuerpos anti-leucocito pueden ponerse en contacto con la muestra. Un soporte sólido particulado puede añadirse, por ejemplo, a la muestra contenida (por ejemplo, suspendida) en un medio apropiado (por ejemplo, un tampón). El soporte puede dejarse en contacto con la muestra (por ejemplo, incubarse) durante una duración de tiempo para permitir que se produzca la unión a las células. Las condiciones durante la etapa no son críticas, y la mezcla muestra-soporte puede incubarse, por ejemplo, a 4°C a 20°C durante 10 minutos a 2 horas, por ejemplo, 20-45 minutos.

Las células T específicas de antígeno se producen frecuentemente a frecuencias muy bajas. La baja frecuencia de las células T específicas de antígeno hace que estas células sean dianas difíciles para aislamiento inmunomagnético. Además, la afinidad de unión entre los complejos MHC-péptido y el TCR es relativamente baja (del orden de 10 μ M) comparado con la afinidad de unión de anticuerpos y sus moléculas diana (en el intervalo de 10⁻⁹-1 nM). La baja afinidad de unión de los complejos MHC-péptido puede compensarse introduciendo múltiples sitios de unión entre la fase sólida usada para el aislamiento de las células y el TCR en la superficie de las células T. En la presente invención, esto se consigue conjugando múltiples complejos MHC-péptido a moléculas poli-ligando. Mediante el acoplamiento de múltiples de dichas moléculas poli-ligando a la fase sólida, se incrementa la avidéz de unión a las células T para facilitar el aislamiento eficiente de las células T diana.

El aislamiento eficiente de las células T específicas de antígeno puede conseguirse acoplando las moléculas de polímero conjugadas con MHC a los lechos o partículas antes de la etapa de aislamiento de células, o indirectamente mezclando construcciones de moléculas MHC solubles con la muestra, antes de introducir lechos o partículas que tienen una afinidad de unión para una parte de la construcción de moléculas MHC.

Después del aislamiento, las células T pueden cultivarse en condiciones que facilitan la proliferación y expansión. La activación y proliferación de las células T depende, como se ha descrito anteriormente, de dos señales diferentes proporcionadas por las células presentadoras de antígeno. La primera señal es la señal específica de antígeno proporcionada por los complejos MHC-péptido al TCR. La segunda señal es una señal no específica de antígeno proporcionada por moléculas co-estimuladoras en las células presentadoras de antígeno. Dichas moléculas co-estimuladoras incluyen B7-1 y B7-2 que interaccionan con la molécula CD28 en las células T, y otras moléculas co-estimuladoras tales como LFA-3, CD3, CD40, ICOS, NKG2D, OX40 y CD137.

Como se ha mencionado anteriormente, la administración de las células expandidas puede ser por cualquier ruta conveniente. Típicamente, el número de células para cada administración debe ser aproximadamente 10⁹-10¹¹ células. Las células pueden administrarse adecuadamente en un volumen de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 1 litro, tal como aproximadamente 50 ml a aproximadamente 500 ml, aproximadamente 50 ml a aproximadamente 250 ml, aproximadamente 50 ml a aproximadamente 150 ml, o aproximadamente 50 ml a aproximadamente 100 ml, dependiendo de la ruta de administración y la enfermedad que se va a tratar. Las células pueden administrarse en una única dosis o como varias dosis. En determinados casos, la administración sólo una vez puede ser suficiente. En general, deben proporcionarse varias dosis con intervalos de un día, una semana, dos semanas, un mes, o varios meses, etc. Por ejemplo, una dosis única puede proporcionarse una vez, o una dosis puede proporcionarse como un cebador, seguido de una o más administraciones, o un régimen de administración continuo como hasta cuatro dosis por semana, seguido de un mes sin administraciones, seguido de hasta cuatro dosis por semana (algunas veces con cantidad creciente o decreciente de las células), etc. Opcionalmente pueden usarse diferentes adyuvantes o combinaciones de adyuvantes en las diferentes administraciones. Éstos son todos ejemplos, y el régimen de administración óptimo depende de las células en cuestión y de varios otros factores. El experto en la técnica sabrá fácilmente cómo optimizar esto. Por supuesto, pueden administrarse otros medicamentos simultáneamente con el fin de aumentar o apoyar el tratamiento.

En particular, una construcción de moléculas MHC como se define en la presente memoria, o una o más construcciones de moléculas MHC sin moléculas MHC unidas, pero con moléculas biológicamente activas unidas puede administrarse junto con la composición terapéutica para estimular, regular al alza, regular a la baja, inhibir o aumentar otros clones de células que reconocen MHC aparte de los clones de células que reconocen MHC abordados por la construcción de moléculas MHC de la composición. Dichas construcciones pueden inmovilizarse opcionalmente en partículas biodegradables.

Los contenedores para mezclar y almacenar la composición terapéutica de la invención pueden ser de vidrio o varios materiales poliméricos. Los contenedores elegidos no deben afectar esencialmente el producto almacenado. Los contenedores pueden ser adecuadamente ampollas o viales tapados para mono o multidosisación.

Usos de las moléculas MHC

En un aspecto especial, la presente invención se refiere a

usos de moléculas MHC en métodos histológicos, y

usos de moléculas MHC en métodos citológicos.

Dichos métodos son métodos con la muestra montada. Los términos "histológico" y "citológico" son como se han definido anteriormente. El término "montado" es como se ha definido anteriormente (métodos con la muestra montada).

Este aspecto de la invención se basa en el reconocimiento sorprendente de que aunque las moléculas MHC o multímeros de moléculas MHC per se pueden no ser adecuados para algunas aplicaciones debido a la baja afinidad intrínseca, se comportan inesperadamente bien en aplicaciones con la muestra montada.

Todas las definiciones, explicaciones, e interpretaciones proporcionadas anteriormente también se aplican *mutadis mutandis* a este aspecto de la invención.

Así, en una realización, la presente invención se refiere al uso de moléculas MHC en un método para determinar la presencia de células que reconocen MHC en una muestra, en el que las células que reconocen MHC de la muestra están montadas en un soporte.

Dichos métodos con una herramienta poderosa en el diagnóstico de varias enfermedades. El establecimiento de un diagnóstico es importante de varias maneras. Un diagnóstico proporciona información acerca de la enfermedad, así se puede ofrecer al paciente un tratamiento adecuado. También, el establecimiento de un diagnóstico más específico puede proporcionar información importante acerca de un subtipo de una enfermedad para la que será beneficioso un tratamiento particular (es decir, varios subtipos de enfermedades pueden implicar la presentación de diferentes péptidos que son reconocidos por células que reconocen MHC, y así el tratamiento puede dirigirse efectivamente frente a un subtipo particular). De esta manera, también puede ser posible obtener información acerca de células aberrantes, que surgen a través del progreso de la enfermedad o afección, o para investigar si se afecta y cómo la especificidad de las células. La unión de la molécula MHC hace posible estas opciones, ya que la unión es indicativa de la presencia de las células que reconocen MHC en la muestra, y de acuerdo con esto la presencia de moléculas MHC que presentan el péptido.

En otra realización, la presente invención se refiere al uso de una molécula MHC en un método para monitorizar la presencia de células que reconocen MHC en una muestra, en el que las células que reconocen MHC de la muestra están montadas en un soporte.

Dichos métodos son una herramienta poderosa en la monitorización del progreso de una enfermedad, por ejemplo, para seguir de cerca el efecto de un tratamiento. El método puede usarse entre otros para gestionar o controlar la enfermedad de una manera mejor para asegurar que el paciente recibe el tratamiento óptimo, para ajustar el tratamiento, para confirmar la remisión o recurrencia, y para asegurar que el paciente no se trata con un medicamento que no cura o alivia la enfermedad. De esta manera, también puede ser posible monitorizar células aberrantes, que surgen a través del progreso de la enfermedad o afección, o para investigar si se afecta y cómo la especificidad de las células T. La unión de la molécula MHC hace posible estas opciones, ya que la unión es indicativa de la presencia de las células que reconocen MHC en la muestra, y de acuerdo con esto la presencia de moléculas MHC que presentan el péptido.

En otra realización más, la presente invención se refiere al uso de una molécula MHC en un método para determinar el estado de una enfermedad que implica células que reconocen MHC, método en el que las células que reconocen MHC de la muestra están montadas en un soporte.

Dichos métodos son una herramienta valiosa para gestionar y controlar varias enfermedades. Una enfermedad podría cambiar, por ejemplo, de un estadio a otro, y así es importante ser capaz de determinar el estado de la enfermedad. De esta manera, también puede ser posible obtener información acerca de células aberrantes, que surgen a través del progreso de la enfermedad o afección, o para investigar si se afecta y cómo la especificidad de las células, determinando de esta manera el estado de una enfermedad o afección. La unión de la molécula MHC hace posible estas opciones, ya que la unión es indicativa de la presencia de las células que reconocen MHC en la muestra, y de acuerdo con esto la presencia de moléculas MHC que presentan el péptido.

En otra realización más, la presente invención se refiere al uso de una molécula MHC en un método para establecer un pronóstico de una enfermedad que implica células que reconocen MHC, método en el que las células que reconocen MHC de la muestra están montadas en un soporte.

Dichos métodos son una herramienta valiosa con el fin de gestionar enfermedades, entre otros para asegurar que el paciente no se trata sin efecto, para asegurar que la enfermedad se trata de la manera óptima, y para predecir las posibilidades de supervivencia o cura. De esta manera, también puede ser posible obtener información acerca de células aberrantes, que surgen a través del progreso de la enfermedad o afección, o para investigar si se afecta y cómo la especificidad de las células T, siendo capaces de esta manera de establecer un pronóstico. La unión de la molécula MHC hace posible estas opciones, ya que la unión es indicativa de la presencia de las células que reconocen MHC en la muestra, y de acuerdo con esto la presencia de moléculas MHC que presentan el péptido.

La presente invención también se refiere al uso de una molécula MHC en métodos para el diagnóstico de una enfermedad que implica células que reconocen MHC, método en el que las células que reconocen MHC de la muestra están montadas en un soporte.

Dichos métodos de diagnóstico son una herramienta poderosa en el diagnóstico de varias enfermedades. El establecimiento de un diagnóstico es importante de varias maneras. Un diagnóstico proporciona información acerca de la enfermedad, así se puede ofrecer al paciente un tratamiento adecuado. También, el establecimiento de un diagnóstico más específico puede proporcionar información importante acerca de un subtipo de una enfermedad para la que será beneficioso un tratamiento particular (es decir, varios subtipos de enfermedades pueden implicar la presentación de diferentes péptidos que son reconocidos por células que reconocen MHC, y así el tratamiento puede dirigirse efectivamente frente a un subtipo particular). También puede obtenerse información valiosa acerca

de células aberrantes, que surgen a través del progreso de la enfermedad o afección, así como si se afecta y cómo la especificidad de las células T. La unión de la molécula MHC hace posible estas opciones, ya que la unión es indicativa de la presencia de las células que reconocen MHC en la muestra, y de acuerdo con esto la presencia de moléculas MHC que presentan el péptido.

- 5 La presente invención también se refiere al uso de una molécula MHC en métodos para correlacionar la morfología celular con la presencia de células que reconocen MHC en una muestra.

Dichos métodos son especialmente valiosos aplicados en el campo de los métodos histológicos, ya que el patrón de unión y distribución de las construcciones de moléculas MHC puede observarse directamente. En dichos métodos, la muestra se trata con el fin de preservar la morfología de las células individuales de la muestra. La información obtenida es importante entre otros en procedimientos de diagnóstico ya que los sitios afectados pueden observarse directamente.

Como se ha mencionado anteriormente, el uso de la molécula MHC es en métodos con la muestra montada. Así, la muestra se monta en un soporte. El soporte se selecciona de una superficie sólida o semi-sólida. En particular, el soporte se selecciona de portaobjetos de vidrio, membranas, filtros, portaobjetos de polímero, portaobjetos con cámara, placas, y placas petri.

La muestra puede seleccionarse adecuadamente de material histológico, material citológico, tumores primarios, metástasis orgánicas secundarias, aspirados con aguja fina, tejido del bazo, muestras de médula ósea, expansiones celulares, muestras citológicas exfoliativas, preparaciones por impronta, frotis orales, frotis laríngeos, frotis vaginales, lavado bronquial, lavado gástrico, del cordón umbilical, y de fluidos corporales tales como sangre (por ejemplo, población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de la sangre o de otras preparaciones derivadas de la sangre tales como productos de leucoféresis), de muestras de esputo, expectorados, y aspirados bronquiales. Éstas pueden someterse a varios tratamientos. Se hace referencia a las definiciones proporcionadas anteriormente, que también se aplican aquí.

La molécula MHC que se va a usar puede ser

- 25 una molécula MHC Clase I seleccionada del grupo que consiste en una cadena pesada, una cadena pesada combinada con una β_2m , una cadena pesada combinada con un péptido, y un dímero cadena pesada/ β_2m con un péptido;

o una molécula MHC Clase II seleccionada del grupo que consiste en un dímero α/β , un dímero α/β con un péptido, dímero α/β combinado mediante una etiqueta de afinidad y un dímero α/β combinado mediante una etiqueta de afinidad con un péptido;

o una molécula semejante a MHC Clase I o una molécula semejante a MHC Clase II.

Las definiciones proporcionadas anteriormente respecto a los términos "molécula MHC", "molécula MHC Clase I" y "molécula MHC Clase II" también se aplican aquí.

La molécula MHC puede ser adecuadamente una molécula MHC de vertebrado tal como una molécula humana, murina, de rata, porcina, bovina o aviar. La explicación respecto a estas moléculas proporcionada anteriormente también se aplica a aquí.

En particular, la molécula MHC que se va a usar puede ser una molécula MHC humana.

La molécula MHC que se va a usar puede ser una molécula MHC que carece de péptido, o una molécula MHC rellena con péptido.

40 La molécula MHC que se va a usar puede estar unida adecuadamente a una entidad de unión. Las entidades de unión adecuadas son aquellas descritas anteriormente, incluyendo estreptavidina (SA) y avidina y derivados de éstas, biotina, inmunoglobulinas, anticuerpos (monoclonal, policlonal, y recombinante), fragmentos de anticuerpo y derivados de éstos, dominio de cremallera de leucina de AP-1 (jun y fos), hexa-his (resto de quelato de metal), hexa-hat GST (glutati6n S-transferasa) afinidad de glutati6n, péptido de uni6n a calmodulina (CBP), Etiqueta Strep, Dominio de Uni6n de Celulosa, Prote6na de uni6n a Maltosa, Etiqueta S-Péptido, Etiqueta de Uni6n a Quitina, Ep6topos Inmunoreactivos, Etiquetas de Ep6topo, Etiqueta E2, Etiqueta de Ep6topo HA, Ep6topo Myc, Ep6topo FLAG, Ep6topos AU1 y AU5, Ep6topo Glu-Glu, Ep6topo KT3, Ep6topo IRS, Ep6topo Btag, Ep6topo de Prote6na Quinasa C, Ep6topo VSV, lecitinas que median la uni6n a una diversidad de compuestos, incluyendo carbohidratos, l6pidos y prote6nas, por ejemplo ConA (*Canavalia ensiformis*) o WGA (aglutinina de germen de trigo) y tetranectina o Prote6na A o G (afinidad de anticuerpo). Debe entenderse que la entidad de uni6n puede ser una combinaci6n de las mencionadas anteriormente.

Cada entidad de uni6n puede tener unidas a ella adecuadamente de 1 a 10 moléculas MHC, tal como de 1 a 9, de 1 a 8, de 1 a 7, de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, 6 1 6 2 moléculas MHC. Dichas moléculas MHC pueden ser iguales o diferentes (es decir, de diferentes especies). Si las moléculas MHC est6n rellenas de péptido, dichos péptidos pueden ser iguales o diferentes. El n6mero de moléculas MHC unidas a la entidad de uni6n s6lo est6

limitado por la capacidad de la entidad de unión. Cuando más de una molécula MHC está unida a una entidad de unión, esto se denomina en la presente memoria un multímero de moléculas MHC, por ejemplo un dímero (dos moléculas MHC), un trímero (tres moléculas MHC), y un tetrámero (cuatro moléculas MHC). Este número debe interpretarse como en promedio, véanse las explicaciones anteriores. Así, no es necesario que el número medio sea un número entero, sino que puede ser cualquier número entre dos números enteros (es decir, un número decimal).

Para permitir la detección de la molécula MHC, la molécula MHC puede comprender además un compuesto marcador. El compuesto marcador es adecuadamente uno que es directamente o indirectamente detectable. Así, el compuesto marcador puede ser un marcador fluorescente, un marcador enzimático, un radioisótopo, un marcador quimioluminiscente, un marcador bioluminiscente, un polímero, una partícula de metal, un hapteno, un anticuerpo, o un agente de tinción. En particular, el compuesto marcador puede seleccionarse de

5- (y 6)-carboxifluoresceína, 5- ó 6-carboxifluoresceína, ácido 6-(fluoresceína)-5-(y 6)-carboxamido hexanoico, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, tetrametilrodamina, y agentes de tinción tales como Cy2, Cy3, y Cy5, cumarina sustituida opcionalmente incluyendo AMCA, PerCP, fibobiliproteínas incluyendo R-ficoeritrina (RPE) y aloficoeritrina (APC), Rojo Texas, Rojo Princenton, proteína verde fluorescente (GFP) y análogos de ésta, y conjugados de R-ficoeritrina y aloficoeritrina y, por ejemplo, Cy5 o Rojo Texas, y marcadores fluorescentes inorgánicos basados en nanocristales semiconductores (como nanocristales quantum dot y Qdot™), y marcadores fluorescentes de tiempo resuelto basados en lantánidos como Eu3+ y Sm3+,

de haptenos tales como DNP, biotina, y digoxigenina,

se selecciona de marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (GAL), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, beta-N-acetil-glucosaminidasa, β-glucuronidasa, invertasa, Xantina Oxidasa, luciferasa de luciérnaga y glucosa oxidasa (GO), o

se selecciona de marcadores luminiscentes tales como luminol, isoluminol, ésteres de acridinio, 1,2-dioxoetanos y piridopiridazinas, o

se selecciona de marcadores radiactivos tales como isótopos incorporados de yodo, cobalto, selenio, tritio, y fósforo.

Un compuesto marcador puede estar unido a la molécula MHC, la entidad de unión, o tanto a la molécula MHC como a la entidad de unión.

Así, la presente invención se refiere a métodos para detectar la presencia de células que reconocen MHC en una muestra que comprende las etapas de

(a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC montada en un soporte,

(b) poner en contacto la muestra con una molécula MHC como se describe en la presente memoria, y

(c) determinar cualquier unión de la molécula MHC, unión que indica la presencia de células que reconocen MHC.

La presente invención se refiere además a métodos para monitorizar células que reconocen MHC que comprenden las etapas de

(a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC montada en un soporte,

(b) poner en contacto la muestra con una molécula MHC como se describe en la presente memoria, y

(c) determinar cualquier unión de la molécula MHC, monitorizando de esta manera las células que reconocen MHC.

La invención también se refiere a métodos para establecer un pronóstico de una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de

(a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC montada en un soporte,

(b) poner en contacto la muestra con una molécula MHC como se describe en la presente memoria, y

(c) determinar cualquier unión de la molécula MHC, estableciendo de esta manera un pronóstico de una enfermedad que implica células que reconocen MHC.

Además, la invención se refiere a métodos para determinar el estado de una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de

(a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC montada en un soporte,

(b) poner en contacto la muestra con una molécula MHC como se describe en la presente memoria, y

(c) determinar cualquier unión de la molécula MHC, determinando de esta manera el estado de una enfermedad que implica células que reconocen MHC.

La presente invención también se refiere a métodos para correlacionar la morfología celular con la presencia de células que reconocen MHC en una muestra que comprende las etapas de

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC montada en un soporte,
- (b) poner en contacto la muestra con una molécula MHC como se describe en la presente memoria, y
- 5 (c) determinar cualquier unión de la molécula MHC, correlacionando de esta manera la unión de la construcción de moléculas MHC con la morfología celular.

Esta invención también comprende métodos para el diagnóstico de una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC montada en un soporte,
- 10 (b) poner en contacto la muestra con una molécula MHC como se describe en la presente memoria, y
- (c) determinar cualquier unión de la molécula MHC, diagnosticando de esta manera una enfermedad que implica células que reconocen MHC.

La invención también se refiere a métodos para determinar la eficacia de un medicamento frente a una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de

- 15 (a) proporcionar una muestra de un sujeto que recibe tratamiento con un medicamento montada en un soporte,
- (b) poner en contacto la muestra con una molécula MHC como describe en la presente memoria, y
- (c) determinar cualquier unión de la molécula MHC, determinando de esta manera la eficacia del medicamento.

La enfermedad puede tener origen inflamatorio, auto-inmune, alérgico, viral, canceroso, infeccioso, alo o xenogénico (injerto frente a huésped y huésped frente a injerto). En particular, la enfermedad puede ser una enfermedad inflamatoria crónica del intestino tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, esclerosis, diabetes tipo I, artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis atópica, asma, melanoma maligno, carcinoma renal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer del útero, cáncer cervical, cáncer prostático, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, linfoma cutáneo, carcinoma hepático, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, enfermedad relacionada con el rechazo, enfermedad relacionada con injerto frente a huésped, o una enfermedad viral asociada con hepatitis, SIDA, sarampión, viruela, varicela, rubéola o herpes.

La definición de "células que reconocen MHC" y ejemplos de células que reconocen MHC proporcionados anteriormente también se aplican aquí.

La muestra que se va a someter a los métodos de la invención puede seleccionarse adecuadamente de material histológico, material citológico, tumores primarios, metástasis orgánicas secundarias, aspirados con aguja fina, tejido del bazo, muestras de médula ósea, extensiones celulares, muestras citológicas exfoliativas, preparaciones por impronta, frotis orales, frotis laríngeos, frotis vaginales, lavado bronquial, lavado gástrico, del cordón umbilical, y de fluidos corporales tales como sangre (por ejemplo, de una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de la sangre o de otras preparaciones derivadas de la sangre tales como productos de leucoféresis), de muestras de esputo, expectorados, y aspirados bronquiales. Éstas pueden someterse a varios tratamientos. Se hace referencia a las definiciones proporcionadas anteriormente que también se aplican aquí.

REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

1. Aplicabilidad de la presente invención en cáncer de mama

Un ejemplo de la utilidad de los métodos de la presente invención que emplean las construcciones de moléculas MHC es el diagnóstico de cáncer de mama así como la selección del régimen terapéutico adecuado para tratar tipos específicos de cáncer de mama.

El cáncer de mama es una de las causas principales de cáncer en las mujeres. Las nuevas estrategias terapéuticas consisten en administrar péptidos sintéticos para inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) frente a antígenos expresados en las células de tumor de mama. Como los CTL son las células inmunes con más capacidad de matar directamente a las células tumorales, las vacunas que inducen estas respuestas inmunes son una opción atractiva para prevenir recurrencias del cáncer o inhibir la progresión del tumor en los estadios tempranos de la enfermedad.

Las muestras de tejido tomadas de un paciente que se sospecha que padece cáncer de mama pueden tomarse, teñirse con construcciones de moléculas MHC de la invención, en las que las moléculas MHC están cargadas con péptidos expresados por las células tumorales, y en tanto que se observa la unión se puede hacer un diagnóstico.

Las muestras de tejido tomadas de un paciente al que ya se ha diagnosticado cáncer de mama pueden tomarse, y teñirse con construcciones de moléculas MHC de la invención moléculas MHC cargadas rellenas con determinados péptidos para investigar si un determinado péptido está implicado en la enfermedad. Si se observa unión, puede seleccionarse el tratamiento óptimo. Por ejemplo, algunos cánceres de mama agresivos expresan HER2/neu, otros no. De acuerdo con esto, dicha información será valiosa en la selección del tratamiento, en el pronóstico de la enfermedad, y en la predicción del progreso de la enfermedad. Otros péptidos de relevancia son los péptidos MAGE, CEA, y pS3.

2. Aplicabilidad de la presente invención para unión específica de CTL

Las muestras de tejido tomadas de un paciente con cáncer tratado con una sustancia terapéutica pueden tomarse, teñirse con construcciones de moléculas MHC de la presente invención cargadas con el alelo MHC correcto, y en la que las moléculas MHC están cargadas con péptidos que reconocen el antígeno específico y CTL infiltrantes en la muestra de tejido de cáncer. Una tinción positiva de (unión a) los CTL indicará la eficacia de la composición terapéutica particular administrada, ya que los CTL inducidos se identifican en el sitio real del cáncer. Mediante procedimientos de tinción doble, pueden teñirse los CTL específicos y todos. Esto proporcionará información adicional sobre la eficacia de la formulación. Por ejemplo, una tinción positiva usando un péptido específico indicará que el péptido correspondiente será particularmente efectivo como un componente en la composición terapéutica. Así, la composición terapéutica puede ajustarse/alterarse según la respuesta del paciente tomando como base la identificación (unión) de los CTL infiltrantes específicos en el tejido canceroso.

Además, los CTL específicos circulantes en la corriente sanguínea pueden identificarse y cuantificarse usando las construcciones de moléculas MHC (con el alelo y péptidos correctos) tomando como diana dichos CTL específicamente, mediante análisis posterior en un citómetro de flujo, mediante lo cual se cuentan las células que se unen. La naturaleza menos invasora del análisis sanguíneo circulante hace el análisis por citometría de flujo útil para la monitorización continua de la respuesta inmune.

Otra estrategia es una combinación de detección de de antígeno y CTL infiltrantes en muestras de tejido canceroso en procedimientos de tinción doble o triple para identificar varias quimioquinas. Las construcciones de moléculas MHC cargadas con moléculas MHC rellenas con péptido apropiadas y opcionalmente otras sustancias (compuestos biológicamente activos) son de hecho una posibilidad. El grado de infiltración de los CTL puede correlacionarse con determinadas quimioquinas y permite la manipulación de CTL específicos para infiltrarse en y matar el cáncer.

También, por la presente invención, dichos CTL pueden aislarse de un paciente por un procedimiento de separación inmunomagnética usando construcciones de moléculas MHC, cargadas con moléculas MHC rellenas de péptido que se unen específicamente a los CTL. Después del aislamiento, los CTL pueden expandirse, opcionalmente estimularse, y re-introducirse en el paciente, bien solos como un tratamiento efectivo o como parte de un tratamiento.

3. Aplicabilidad de la presente invención en conexión con trasplante

La presente invención también puede usarse para seguir la respuesta de células T frente a determinados virus en pacientes trasplantados. Los pacientes trasplantados son susceptibles frecuentemente a ataques de virus debido a la terapia inmunosupresora necesaria para evitar el rechazo del injerto. Mediante la monitorización del desarrollo post-trasplante de células T específicas de virus que ayudan en virus posibles, puede ajustarse el tratamiento inmunosupresor u otra medicina preventiva para concordar el estado inmune del paciente. Esto puede hacerse usando construcciones de moléculas MHC, en las que las moléculas MHC están cargadas con péptidos reconocidos por dichas células T que surgen de una infección en progreso. Los ejemplos de virus que un médico puede querer monitorizar son CMV (citomegalovirus) y EBV (virus de Epstein-Barr).

Otra estrategia será aislar y expandir hasta un número clínicamente relevantes células capaces de luchar contra dicha infección. El aislamiento puede hacerse usando la construcción de moléculas MHC apropiada capaz de unirse a dichas células, y posteriormente dichas células unidas pueden separarse por un procedimiento de separación inmunomagnética o por citometría de flujo. Las células pueden expandirse y opcionalmente estimularse o activarse adicionalmente, y re-introducirse en el paciente para ayudar al sistema inmune del paciente a luchar contra la infección.

La presente invención también puede usarse para monitorizar la respuesta de las células T en pacientes trasplantados frente al tejido de injerto o de huésped. Se aplica la construcción de moléculas MHC apropiada, y la unión observada se usa para ajustar el tratamiento inmunosupresor para correlacionarlo con el estado inmune del paciente.

4. Aplicabilidad de la presente invención en conexión con varias infecciones

La presente invención puede usarse para detectar y monitorizar la respuesta de las células T (o, más correctamente, los receptores de las células T específicos) en conexión con enfermedades complejas tales como gripe, tuberculosis, malaria, herpes simple, y clamidia. Las construcciones de moléculas MHC, en las que las moléculas MHC están cargadas con los péptidos apropiados pueden aplicarse en la detección y monitorización.

La información así obtenida puede usarse para deducir nuevos esquemas de tratamiento, o incluso para desarrollar nuevos medicamentos.

Las células capaces de luchar contra la infección también pueden obtenerse usando construcciones de moléculas MHC apropiadas. El aislamiento puede hacerse usando un procedimiento de separación inmunomagnética o por citometría de flujo. Las células así obtenidas pueden expandirse en condiciones adecuadas, opcionalmente estimularse o activarse adicionalmente, y re-introducirse en el paciente.

5. Preparación de molécula SA amida poli acrílica

Se prepara una molécula vehicular de amida poli acrílica que tiene unida a ella una pluralidad de estreptavidina (SA) como entidades de unión según el procedimiento siguiente.

10 La estreptavidina (SA, Genzyme) se dializa toda la noche (100 mg en 5 ml, frente a 1.000 ml, 0,10 M NaCl, 2-4^oC, 10 kDa MwCO, cambio tres veces). En lo que sigue, todos los tampones se saturan con nitrógeno antes del uso. El éster N-hidroxisuccinimida del ácido acrílico (Sigma Chemical Co., número de catálogo A8060) almacenado en el congelador se deja permanecer a temperatura ambiente durante una hora antes de abrirlo y disolverlo en NMP seco (7 mg/ml) y se añade lentamente a una disolución agitada de SA (en total 0,140 ml disolución de NMP/ml, 5 mg/SA/ml, 0,1 M NaCl, 25 mM tampón carbonato, pH 8,5) y se agita a 30^oC bajo atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. Cualesquiera grupos reactivos remanentes se apantallan por la adición de 1/10 volumen de mezcla de reacción de un tampón que contienen etanolamina (110 mM etanolamina, 50 mM HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,0) y se agita durante 30 minutos a 30^oC.

20 La polimerización se inicia por la adición de disolución de persulfato de amonio al 10% en agua (persulfato de amonio, >98%, Sigma número de catálogo A3678) a la disolución (0,005 ml por ml), seguido de la adición de N,N,N".N"-tetrametilendiamina (TEMED) (Sigma número de catálogo T9281, 0,005 ml por ml). La mezcla de reacción se agita durante 4 horas a 30^oC. La mezcla de reacción parcialmente no homogénea se transfiere a un tubo de diálisis y se dializa frente a un volumen en exceso de 100 veces de 0,10 M NaCl (2-4^oC, 10 kDa MwCO, cambio tres veces durante 24 horas). La disolución que contiene el conjugado polimérico se filtra a través de un filtro de polisulfona de 20 my antes de purificarse de SA sin unir mediante filtración en gel (FPLC, Pharmacia, S-500, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,2). Sólo las fracciones claramente separadas de la SA libre y no en el pico vacío se recogen como la fracción de molécula SA amida poli acrílica. El grado de incorporación de SA en la molécula vehicular amida poli acrílica puede calcularse a partir de la absorbancia UV a 278 nm. La molécula vehicular SA amida poli acrílica se concentra hasta aproximadamente 3,0 mg SA por ml. La molécula puede marcarse con un marcador, por ejemplo, FITC o Alexa como se describe más adelante.

6. Preparación de moléculas vehiculares de dextrano y pululano modificado en carboxilo

35 El dextrano (500 kDa, Pharmacia BioTech, T-500, número de catálogo 17-0320-2) o pululano (Sigma, número de catálogo 70051, Mw 400 kDa, polidispersidad MW/MN= 1,38) se disuelve en agua, se enfría en hielo y se añade hidróxido de potasio y ácido monocloroacético (Fluka, número de catálogo 24510) (en total, 1,0 mg dextrano o pululano/ml, 0,58 mg ácido monocloroacético/ml, enfrío en hielo, agitación durante 4 horas). El pH en la disolución de reacción se ajusta hasta pH 7 mediante la adición lenta de ácido clorhídrico diluido mientras se agita en un baño de hielo. La disolución se dializa extensamente frente a agua (volumen en exceso de 100 veces, temperatura ambiente, 10 kDa MwCO, y cambio seis veces durante 24 horas). La disolución diluida se recoge y se liofiliza durante varios días para rendir un polvo completamente seco. El grado de activación carboxil metilo se mide por análisis de RMN de protón comparando los integrales del grupo metilo a 4,2 ppm con los integrales del núcleo carbohidrato. El polvo seco se almacena en un desecador a temperatura ambiente.

7. Preparación de anticuerpo anti-biotina de conejo o SA unida a dextrano modificado en carboxilo o unido a pululano modificado en carboxilo

45 Las moléculas vehiculares que son dextrano modificado en carboxilo o pululano modificado en carboxilo que tienen unidas a ellas un número de entidades de unión que son anticuerpo anti-biotina de conejo o SA pueden prepararse de la manera siguiente. El dextrano modificado en carboxilo o pululano modificado en carboxilo se disuelve y se añade N-hidroxisuccinimida (Aldrich No. cat. 13067-2) e hidrocioruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC, Aldrich, número de catálogo E6383, 191.7) (2,0 mg carbohidrato modificado en carboxilo/ml, 1,42 mg NHS-OH/ml, 0,59 mg EDAC/ml, 50 mM ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico ("MES", Aldrich, número de catálogo M8250), 100 mM NaCl, pH 6,0) seguido de agitación a temperatura ambiente durante una hora. Se añade la proteína de unión dializada, anticuerpo anti-biotina de conejo purificada por afinidad fab2 o SA (en total 1,06 mg carbohidrato modificado en carboxilo activado/ml, 5,3 mg anti-biotina de conejo/mL ó 6,4 mg estreptavidina/mL, 50 mM MES, 100 mM NaCl, pH 6,0). Después de permanecer toda la noche a temperatura ambiente, cualesquiera grupos reactivos remanente se apantallan por la adición de 1/10 el volumen de la mezcla de reacción de un tampón que contiene etanolamina (110 mM etanolamina, 50 mM HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,0) y se agita durante 30 minutos a 30^oC. La disolución que contiene la molécula vehicular conjugada con la entidad de unión se filtra a través de un filtro de polisulfona de 20 my antes de purificarse de proteína sin unir mediante filtración en gel (FPLC, Pharmacia, S-500, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,2). Sólo la fracción claramente separada de la estreptavidina libre y no en el primer pico de exclusión se recoge como la fracción de conjugado. El grado de unión de anticuerpo o SA a la molécula

vehicular puede calcularse a partir de la absorbancia UV a 278 nm. La molécula vehicular conjugada con la entidad de unión se concentra hasta aproximadamente 3,0 mg anticuerpo o proteína por ml. El conjugado se marca con una pluralidad de compuestos marcadores, por ejemplo, FITC o Alexa como se describe más adelante.

8. Preparación de moléculas SA N-vinilpirrolidona/N-acrilamida

5 Aquí, la molécula vehicular es copolímero N-vinilpirrolidona/N-acriloxisuccinimida y la entidad de unión es SA.

Se prepara co-polímero N-vinilpirrolidona/N-acriloxisuccinimida activado por copolimerización de N-vinilpirrolidona (NVP, Aldrich) y éster N-hidroxisuccinimida del ácido acrílico (Sigma Chemical Co., número de catálogo A8060) según los procedimientos estándar. El co-polímero N-vinilpirrolidona/N-acriloxisuccinimida en NMP (aproximadamente 200 kDa con distribución amplia de peso molecular, 10 mg/ml NMP) se añade gota a gota a SA dializada en disolución mientras se agita (en total, 6,0 mg SA/ml, 1,0 mg copolímero/ml, 100 mM NaCl, 50 mM carbonato, pH 9,0, 30°C, 6 horas), Cualesquiera grupos reactivos remanentes se apantallan por la adición de 1/10 volumen de mezcla de reacción de un tampón que contienen etanolamina como anteriormente, y la disolución turbia de conjugado de polímero se filtra a través de un filtro de polisulfona de 20 my antes de purificarlo de SA sin unir mediante filtración en gel y concentrar hasta aproximadamente 3,0 mg SA por ml como se ha descrito anteriormente. El conjugado se marca con una pluralidad de compuestos marcadores, por ejemplo, FITC o Alexa como se describe más adelante.

9. Preparación de construcciones de moléculas MHC

Para preparar las construcciones de moléculas MHC a partir de las moléculas anteriores pueden unirse 5-8 moléculas MHC a las moléculas vehiculares conjugadas con la entidad de unión añadiendo moléculas MHC biotiniladas a los conjugados en un tampón PBS. Las moléculas MHC pueden seleccionarse según se desee (por ejemplo, HLA, o varios alelos de HLA). Las moléculas MHC pueden estar rellenas de péptido o vacías, según se desee.

10. Construcción de moléculas MHC, en la que la molécula MHC está unida directamente a la molécula vehicular

El ejemplo siguiente ilustra la conjugación de moléculas MHC directamente a una molécula vehicular de polímero activado que es dextrano 500 kDa en condiciones suaves.

La molécula MHC purificada (100 nM cadena pesada que contiene el péptido de interés y β_2m) se añade a dextrano activado con vinilsulfona (500 kDa, aproximadamente 25% activado, en total 2 ng dextrano/ml, 10 ng molécula MHC/ml, 200 mM MES, 100 mM NaCl, pH 6,0). Se añade lentamente una disolución saturada de sulfato de amonio a la mezcla (en total 60% del volumen original) mientras se agita. Después de 6 horas a 30°C, la mezcla se centrifuga (10.000 g), la disolución clara se elimina y el sedimento se disuelve en agua (0,25 ml por mg de proteína). Cualesquiera grupos reactivos remanentes se apantallan por la adición de 1/10 volumen de mezcla de reacción de un tampón que contiene etanolamina como se ha descrito previamente, y la disolución de conjugado de polímero se filtra a través de un filtro de polisulfona de 20 my antes de purificarlo de proteína no unida por filtración en gel, proporcionando más de 5 moléculas MHC por cadena de dextrano de media, y concentrarlo hasta aproximadamente 3,0 mg molécula MHC por ml como se ha descrito previamente. La construcción se marca con un compuesto marcador adecuado, por ejemplo, FITC o Alexa según los procedimientos siguientes.

11. Preparación de construcciones de moléculas MHC, en las que el compuesto marcador es fosfatasa alcalina (AP)

El ejemplo siguiente ilustra la unión (conjugación) de construcciones de moléculas MHC en las que una pluralidad de moléculas MHC y una pluralidad de compuestos marcadores se unen directamente a una molécula vehicular. La molécula vehicular es dextrano, y el compuesto marcador es AP.

La molécula MHC purificada (100 nM cadena pesada que contiene el péptido de interés y β_2m) y AP dializada (Roche, dializada frente a 100 mM NaCl) se añaden a dextrano activado con vinilsulfona (500 kDa, aproximadamente 25% activado, en total 2 ng dextrano/ml, 10 ng molécula MHC/ml, 20 ng AP/ml, 200 mM MES, 100 mM NaCl, pH 6,0). Se añade lentamente una disolución saturada de sulfato de amonio a la mezcla (en total 60% del volumen original) mientras se agita. Después de 6 horas a 30°C, la mezcla se centrifuga (10.000 g), la disolución clara se elimina y el sedimento se disuelve en agua (0,25 ml por mg de molécula MHC). Cualesquiera grupos reactivos remanentes se apantallan por la adición de 1/10 volumen de mezcla de reacción de un tampón que contiene etanolamina como se ha descrito previamente, y la disolución de conjugado de polímero se filtra a través de un filtro de polisulfona de 20 my antes de purificarlo de proteína no unida por filtración en gel. Al conjugado se añade proteína y estabilizadores enzimáticos.

La invención se ilustra además por los ejemplos siguientes, no limitativos.

EJEMPLOS

Hasta ahora, se han usado varios ejemplos de unión específica de moléculas MHC Clase I y II oligomerizadas, por ejemplo, tetrámeros, para identificar poblaciones de células T específicas de epítipo peptídico. La alta avidéz de los complejos MHC oligoméricos, por ejemplo, tetrámeros, ha añadido una herramienta nueva y significativa para

analizar respuestas de células T clonales frente a organismos patogénicos y antígenos. En los ejemplos siguientes, se ha abordado la unión de construcciones de moléculas MHC multi-valentes de la invención.

5 Los ejemplos descritos a continuación intentan caracterizar la unión específica de péptido y de alta avididad de moléculas MHC que presentan poli-ligandos para diferentes clones y líneas de células T específicas de epítipo peptídico cuando éstas se presentan en la forma de construcciones según la invención.

Se encontró sorprendentemente que la avididad de unión mejorada, generada por la alta valencia de las construcciones de moléculas MHC según la invención, resulta en una detección mejorada de poblaciones de células T sutiles comparado con los tetrámeros de moléculas MHC de la técnica anterior.

EJEMPLO 1

10 Producción de moléculas MHC poli-ligando y tetrámeros

A. Producción de moléculas vehiculares con entidades de unión

Dextrano activado con vinilsulfona

15 Se activaron dextransos de diferentes tamaños moleculares (150 y 270 kDa de Pharmacosmos, 500 kDa de Pharmacia) con divinilsulfona (Aldrich) según la descripción de A. Lihme y T. Boenisch ("Water soluble, polymer based reagents and conjugates comprising moieties derived from divinyl sulfone", WO 93/01498, ref. 22) resultando en un grado de activación por vinilsulfona de aproximadamente 25% de las unidades monoméricas.

Conjugados FITC-estreptavidina-dextrano (150, 270, 500 kDa)

Se dializó estreptavidina (SA, Genzyme) toda la noche (100 mg en 5 ml, frente a 1.000 ml 0,10 M NaCl, 2-4°C, 10 kDa MwCO, cambiado tres veces).

20 Se añadió una disolución de isotiocianato de fluoresceína (FITC, Moléculas Probes) (14,0 mg/ml DMF) a una mezcla agitada de estreptavidina (14,0 mg SA/ml, 0,19 mg FITC/ml, 0,1 M NaCl, 25 mM tampón carbonato, pH 8,5, 30°C).

Después de 6 horas, la mezcla de reacción se añadió a una disolución de dextrano activado con vinilsulfona (aproximadamente 25% activado) de 150, 270 ó 500 kDa (en total 1,6 mg dextrano vinilsulfona/ml, 7,7 mg SA/ml, 0,1 M NaCl, 25 mM tampón carbonato, pH 8,5) y se agitó a 30°C durante 18 horas.

25 Cualesquiera grupos reactivos remanentes se apantallaron por la adición de 1/10 volumen de mezcla de reacción de un tampón que contiene etanolamina (110 mM etanolamina, 50 mM HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,0) y se agitó durante 30 minutos a 30°C.

El conjugado polimérico obtenido se purificó de fluoresceína libre y estreptavidina no unida por filtración en gel (FPLC, Pharmacia, S-200, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,2).

30 El grado de incorporación de fluoresceína y estreptavidina pudo calcularse a partir de la absorbancia UV a 278 y 498 nm en las tres fracciones que contenían conjugado, estreptavidina no unida y fluoresceína no unida, respectivamente. A los conjugados se añadió azida sódica a 15 mM como un conservante.

Molécula dextrano	vehicular	SA por dextrano	FITC por SA	Concentración de dextrano (mol/l)
150		4,4	2,7	61,1x10 ⁻⁸
270		6,9	2,6	54,7x10 ⁻⁸
500		13,6	2,7	31,2x10 ⁻⁸

35 A no ser que se indique otra cosa, los dextransos 500, 270 y 150 kDa conjugados con FITC usados en los ejemplos descritos a continuación se conjugaron de media con aproximadamente 13,6 (en el caso del dextrano 500 kDa), 6,9 (en el caso del dextrano 270 kDa) y 4,4 (en el caso del dextrano 150 kDa) complejos SA por molécula de dextrano.

Preparación de conjugados HRP-estreptavidina-dextrano (70, 150, 270 kDa)

Se dializaron peroxidasa de rábano (HRP, Fairzyme) y estreptavidina (SA, Genzyme) toda la noche (100 mg en 5 ml, frente a 1.000 ml 0,10 M NaCl, 2-4°C, 10 kDa MwCO, cambiado tres veces) antes de concentrarlo. La conjugación se realizó por la adición secuencial de HRP y estreptavidina a dextrano activado.

40 La disolución de HRP se añadió a una disolución de dextrano activado con vinilsulfona (aproximadamente 25% activado) de 70, 150 ó 270 kDa (en total 40,0 mg HRP/ml, 1,6 mg dextrano/ml, 25 mM carbonato, 0,1 M NaCl, pH 8,5) y se agitó en un baño de agua (30°C, 6,0 horas). La disolución de estreptavidina se añadió a la mezcla de

reacción (en total 9,14 mg estreptavidina/ml, 1,06 mg dextrano/ml, 26,67 mg HRP/ml, 25 mM carbonato, 0,10 M NaCl, pH 8,5) y se agitó toda la noche en un baño de agua (30°C, 18 horas).

5 Cualesquiera grupos reactivos remanentes se apantallaron por la adición de 1/10 volumen de mezcla de reacción de un tampón que contiene etanolamina (110 mM etanolamina, 50 mM HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,0) y se agitó durante 30 minutos a 30°C.

El conjugado se separó de estreptavidina y HRP no conjugadas por filtración en gel (FPLC, Pharmacia, S-200, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,2).

10 El grado de incorporación de HRP y estreptavidina pudo calcularse a partir de la absorbancia UV a 280 y 403 nm de la fracción que contenía el conjugado y la fracción que contenía estreptavidina y HRP. A los conjugados se añadió BSA como estabilizador de proteínas y bronidox como conservante.

Molécula dextrano	vehicular	SA por dextrano	HRP por dextrano	Concentración de dextrano (mol/l)
70		3,0	2,3	10,5x10 ⁻⁸
150		5,4	3,7	7,0x10 ⁻⁸
270		8,0	5,3	4,6x10 ⁻⁸

B. Producción de moléculas MHC cargadas con péptido

Las cadenas pesada y ligera (β_2m) de HLA Clase I se produjeron y purificaron parcialmente como cuerpos de inclusión a partir de una cepa de E. coli (BL21 (DE3), Novagen (Novagen, Inc, Madison, WI, EEUU) según un procedimiento estándar.

15 Las moléculas de cuerpos de inclusión aisladas se solubilizaron en 8M urea en condiciones no reductoras para obtener molécula de cadena pesada con enlaces disulfuro intactos. La molécula de cadena pesada se purificó adicionalmente por cromatografía de exclusión por tamaño e intercambio iónico según un procedimiento estándar y finalmente se sometió a plegamiento como se describe a continuación.

20 Se generaron complejos HLA Clase I específicos de epítipo peptídico in vitro usando una estrategia de "plegamiento por dilución" en la que las preparaciones altamente purificadas de molécula de cadena pesada de HLA Clase I desnaturalizada (aproximadamente 10-20 μ M en 8M urea) A0201, 1-275) se renaturalizaron por incubación en un tampón de dilución de 100 veces (la concentración final de cadena pesada es así aproximadamente 100-200 nM) que contenía el péptido de interés (10 μ M) y β_2m (1 μ M), durante 16 horas a 18°C. La cadena pesada de HLA Clase I plegada erróneamente se precipitó por centrifugación antes de la purificación de la molécula HLA Clase I plegada *de novo* por cromatografía de exclusión por tamaño G75 según un procedimiento estándar. La fracción de molécula HLA plegada A0201 fue ruinosamente aproximadamente 40-50% de la cantidad total de molécula de cadena pesada HLA A0201 añadida a la reacción de plegamiento. La fracción de molécula de cadena pesada plegada erróneamente contenía enlaces disulfuro inapropiados y no estaba disponible para renaturalización. Este esquema de plegamiento, descrito anteriormente, fue útil para la generación rápida de una variedad de complejos MHC Clase I monoméricos cargados con péptido codificados por los complejos de gen HLA y H-2 polimórficos. Los complejos purificados finalmente se monobiotinilaron enzimáticamente utilizando proteína ligasa BIR A como describe el fabricante (AVIDITY; Denver, Co, EEUU).

C. Producción de moléculas HLA Clase I vacías de péptido

35 Se produjo MHC Clase I vacía de péptido en un proceso en el que los complejos MHC Clase I mono-biotinilados funcionales (véase, el ejemplo 1B) se desnaturalizaron inicialmente por la adición de urea (8M) o guanidina (6M). Los tampones caotróficos disociaron las subunidades estructurales de la molécula del complejo Clase I, dejando moléculas de cadena pesada biotinilada soluble libre y β_2m soluble libre disponibles para purificación bioquímica. La molécula de cadena pesada se excluyó del β_2m y péptido disociado por cromatografía de exclusión por tamaño G75 según un procedimiento estándar. La molécula de cadena pesada purificada forma espontáneamente un complejo hetero-dímero receptor de péptido que consiste en cadena pesada y ligera en un tampón de plegamiento que contiene β_2m en exceso (véase el Ejemplo 1:B anteriormente en la presente memoria). El dímero HLA Clase I vacío de péptido permaneció estable en exceso de β_2m y pudo ligarse a estreptavidina para formar la construcción vacía de péptido de la invención o tetrámero vacío de péptido. El péptido (1 μ M) de interés se añadió durante o después del proceso de ligación con dextrano soluble o conjugado con SA para generar moléculas MHC de unión a TCR en la forma de construcciones de moléculas MHC de la invención o tetrámeros de moléculas MHC.

D. Producción de construcciones de moléculas MHC poli-ligando de la invención

Las preparaciones de dextranos conjugados con SA de diferentes tamaños moleculares se mezclaron con cantidades de complejos HLA correspondientes a una proporción de dos moléculas HLA Clase I biotiniladas por

molécula SA. La molécula HLA se añadió directamente a una disolución de dextranos conjugados con SA. Así, se formaron construcciones de moléculas MHC que comprenden

- 5 (1) una molécula vehicular que es un dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 moléculas HLA Clase I biotiniladas (moléculas MHC) mediante aproximadamente 13,6 SA marcada con FITC (entidades de unión) (de media 2 moléculas HLA Clase I por SA), cada SA marcada de media con 2,7 FITC,
- (2) una molécula vehicular que es un dextrano 270 kDa que tiene unido a él aproximadamente 13,8 moléculas HLA Clase I biotiniladas (moléculas MHC) mediante aproximadamente 6,9 SA marcada con FITC (entidades de unión) (de media 2 moléculas HLA Clase I por SA), cada SA marcada de media con 2,6 FITC,
- 10 (3) una molécula vehicular que es un dextrano 150 kDa que tiene unido a él aproximadamente 8,8 moléculas HLA Clase I biotiniladas (moléculas MHC) mediante aproximadamente 4,4 SA marcada con FITC (entidades de unión) (de media 2 moléculas HLA Clase I por SA), cada SA marcada de media con 2,7 FITC,
- (4) una molécula vehicular que es un dextrano 70 kDa que tiene unido a él aproximadamente 6,0 moléculas HLA Clase I biotiniladas (moléculas MHC) mediante aproximadamente 3,0 SA (entidades de unión) (de media 2 moléculas HLA Clase I por SA), cada dextrano marcado de media con 2,3 enzimas HRP,
- 15 (5) una molécula vehicular que es un dextrano 270 kDa que tiene unido a él aproximadamente 10,8 moléculas HLA Clase I biotiniladas (moléculas MHC) mediante aproximadamente 5,4 SA (entidades de unión) (de media 2 moléculas HLA Clase I por SA), cada dextrano marcado de media con 3,7 enzimas HRP,
- 20 (6) una molécula vehicular que es un dextrano 270 kDa que tiene unido a él aproximadamente 16,0 moléculas HLA Clase I biotiniladas (moléculas MHC) mediante aproximadamente 8,0 SA (entidades de unión) (de media 2 moléculas HLA Clase I por SA), cada dextrano marcado de media con 5,3 enzimas HRP.

La unión de este alto número de moléculas HLA Clase I fue posible debido a la alta afinidad entre SA y biotina (constante de disociación de afinidad; $K_D = 10^{15}$).

Mediante este procedimiento, se prepararon las siguientes construcciones de moléculas MHC de la presente invención:

- 25 una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el análogo de péptido MART-1 (ELAGIGILTV) y β_2m mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,7 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 1),
- 30 una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 270 kDa que tiene unido a él 13,8 moléculas HLA A0201 biotiniladas en complejo con el análogo de péptido MART-1 (ELAGIGILTV) y β_2m mediante 6,9 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,6 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 2),
- 35 una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 150 kDa que tiene unido a él 8,8 moléculas HLA A0201 biotiniladas en complejo con el análogo de péptido MART-1 (ELAGIGILTV) y β_2m mediante 4,4 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,7 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 3),
- 40 una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 HLA A0201 biotiniladas en complejo con los aminoácidos de la proteína matriz de influenza 58-66 (GILGFVFTL) y β_2m mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,7 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 4),
- una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el péptido R9V de P53 de tipo salvaje (RMPEAAPPV) y β_2m mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,7 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 5),
- 45 una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el péptido G11V de P53 de tipo salvaje (GLAPPQHLIRV) y β_2m mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,7 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 6),
- 50 una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 HLA A0201 vacías de péptido biotiniladas mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,7 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 7),
- una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el péptido gp100 KTWGQYWV y β_2m mediante 13,6 SA marcada

- con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,7 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 8),
- 5 una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 cadena pesada de HLA A0201 en complejo con el análogo de péptido MART-1 (ELAGIGILTV) y β_2m yodado mediante 13,6 SA (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA), que tiene una radiactividad de 100.000 cpm/muestra) (construcción de moléculas MHC 9),
- 10 una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 270 kDa que tiene unido a él 16,0 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el análogo de péptido Mart-1 (ELAGIGILTV) y β_2m mediante 8,0 SA (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA) y 5,3 enzimas HRP al dextrano (construcción de moléculas MHC 10),
- 15 una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el análogo de péptido sur1/M2 (LMLGEFLKL) y β_2m mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,7 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 11),
- una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 150 kDa que tiene unido a él 10,8 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el análogo de péptido MART-1 (ELAGIGILTV) y β_2m mediante 5,4 SA (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA) y 3,7 enzimas HRP al dextrano (construcción de moléculas MHC 12),
- 20 una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 70 kDa que tiene unido a él 16,0 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el análogo de péptido MART-1 (ELAGIGILTV) y β_2m mediante 3,0 SA (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA) y 2,3 enzimas HRP al dextrano (construcción de moléculas MHC 13),
- una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el péptido MAGE-3 (FLWGPRLV) y β_2m mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,7 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 14),
- 25 una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 500 kDa que tiene unido a él 14,1 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el análogo de péptido MART-1 (ELAGIGILTV) y β_2m mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 1 molécula HLA A0201 por SA, y de media 2 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 15),
- una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 500 kDa que tiene unido a él 14,1 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el análogo de péptido MART-1 (ELAGIGILTV) y β_2m y 7,1 moléculas MIC A mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 1 molécula HLA A0201 por SA, y de media 2 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 16),
- 30 una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 500 kDa que tiene unido a él 14,1 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el péptido gp100 KTWGQYWVOV y β_2m mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 1 molécula HLA A0201 por SA, y de media 2 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 17),
- 35 una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 500 kDa que tiene unido a él 14,1 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el péptido gp100 KTWGQYWVOV y β_2m y 7,1 moléculas MIC A mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 1 molécula HLA A0201 por SA, y de media 2 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 18).
- 40 EJEMPLO 2
- Producción de tetrámeros de moléculas MHC
- La molécula HLA específica de epítipo peptídico usada para los tetrámeros se generó como se describe en el Ejemplo 1, B. Los tetrámeros se formaron por la adición secuencial de pequeñas cantidades de SA conjugada con PE (Molecular Probes, Holanda) a una disolución de complejos HLA biotinilados. La cantidad final de complejo HLA
- 45 en la mezcla debe ser cuatro veces la cantidad de SA para asegurar la saturación (cuatro sitios de unión de biotina por complejo SA).
- Mediante este procedimiento, se prepararon los tetrámeros siguientes:
- Un tetrámero marcado con PE que consiste en cuatro HLA A0201 biotiniladas en complejo con el péptido MART-1 modificado (ELAGIGILTV) y β_2m (tetrámero 1),
- 50 un tetrámero marcado con PE que consiste en cuatro HLA A0201 biotiniladas en complejo con el péptido gp100 (KTWGQYWVOV) y (tetrámero 2) y β_2m ,

un tetrámero marcado con PE que consiste en cuatro HLA A0201 biotiniladas en complejo con los aminoácidos de la proteína matriz de influenza 58-66 (GILGFVFTL) (tetrámero 3),

un tetrámero marcado con PE que consiste en cuatro HLA A0201 biotiniladas en complejo con el péptido R9V de P53 de tipo salvaje (RMPEAAPPV) (tetrámero 4),

- 5 un tetrámero marcado con PE que consiste en cuatro HLA A0201 biotiniladas en complejo con el péptido G11V de P53 de tipo salvaje (GLAPPQHLIRV) (tetrámero 5),

un tetrámero vacío de péptido marcado con PE que consiste en cuatro HLA A0201 vacías de péptido marcadas con PE (tetrámero 6).

EJEMPLO 3

- 10 La unión dependiente de la dosis de construcciones de moléculas MHC según la invención comparado con tetrámeros de moléculas MHC a la célula T es específica de péptido

En este experimento, se investigó la unión de construcciones de moléculas MHC específicas de epítipo peptídico de la invención y tetrámeros de moléculas MHC a clones de células T establecidos.

- 15 Se utilizaron clones de células T previamente establecidos y caracterizados "internamente", denominados 5/127 y 5/130, que reaccionaban frente a antígenos de tumor específicos de melanoma, para analizar la unión de las construcciones de moléculas HLA (es decir, construcciones de moléculas MHC) de la invención a TCR en las superficies celulares por citometría de flujo según un protocolo estándar de citometría de flujo. Brevemente, se incubaron 5×10^5 células en 50 μ l de "tampón FACS" (disolución salina tamponada con fosfato (PBS), 10 mg/ml albúmina de suero bovino (BSA), 0,2% azida) bien con las construcciones de moléculas MHC poli-ligando de la invención o los tetrámeros, que presentan los péptidos de interés. A no ser que se indique otra cosa, las células se lavaron una vez en el tampón FACS y se analizaron en un citómetro de flujo Becton Dickenton FACSCalibur.

Los dos clones de células T reaccionaron específicamente con péptidos unidos a HLA A0201 de los antígenos asociados a tumor (melanoma) MART-1 y gp100, respectivamente.

Se usaron las siguientes construcciones de moléculas HLA poli-ligando de la invención:

- 25 Construcción de moléculas MHC 1,
 Construcción de moléculas MHC 2,
 Construcción de moléculas MHC 3.

Se usaron los siguientes tetrámeros de moléculas MHC:

- Tetrámero 1,
 30 Tetrámero 2.

Los tetrámeros marcados con PE 1 y 2 se usaron para comparación.

- Los clones de células T 5/127 y 5/130 se descongelaron y crecieron 24 horas a 37⁰C en presencia de 50U IL-2 y 10% suero humano. Aproximadamente 5×10^5 clones de células T se incubaron 1 hora a 22⁰C con dosis graduales de construcción de moléculas MHC de la invención (construcción de moléculas MHC 1: 0-9,36 nM, diluciones de 2 veces, véase la Figura 25; construcción de moléculas MHC 2: 0-27,5 nM, diluciones de 2 veces, véase la Figura 25; construcción de moléculas MHC 3: 0-37,5 nM, diluciones de 2 veces, véase la Figura 25) o tetrámeros marcados con PE (tetrámeros 1 y 2; 0-200 nM, diluciones de 2 veces, véase la Figura 25). Después de la incubación, las células se lavaron sólo una vez para evitar la disociación de construcciones o tetrámero de moléculas MHC unidas con baja avidéz, y se analizaron por citometría de flujo según procedimientos estándar de citometría de flujo para construcción de moléculas MHC (resultados mostrados en la Figura 25B) y tetrámero marcado con PE (resultados mostrados en la Figura 25A). unidos a células.

- El clon 5/127 de células T específico de péptido MART-1 (indicado como cuadrados en la Figura 25A) se unió a tetrámeros que presentaban el péptido ELAGIGILTV (cuadrados abiertos) con alta avidéz. La tinción mitad de la máxima de las células T 5/127 se observó por la adición de 20-30 nM de los tetrámeros. En el experimento control, la preparación de tetrámeros que presentaba el péptido gp100 KTWGQYWV (cuadrados llenos) no interaccionó con los clones de células T 5/127. En comparación, el clon de células T 5/130 reactivo a gp100 se tiñó con los tetrámeros que presentaban el péptido gp100 KTWGQYWV (círculos negros) y sólo interaccionó débilmente con altas concentraciones de tetrámeros que presentaban el péptido ELAGIGILTV (círculos abiertos). La unión de tetrámeros específicos de péptido a las dos líneas de células T mostró que aproximadamente 100 nM de tetrámeros casi saturaron la línea celular 5/127, mientras la línea celular 5/130 sólo se tiñó parcialmente debido a unión de baja avidéz. Aunque las preparaciones de tetrámeros específicas de péptido se unieron claramente con diferente avidéz, los datos demostraron claramente que ambas líneas celulares unieron específicamente complejos péptido-HLA

apropiados. Así, se concluyó que ambos clones de células T eran útiles para el análisis de las construcciones de la invención.

Para los análisis posteriores de la unión de diferentes construcciones de la invención y para comparación con las construcciones de tetrámeros, se eligieron los clones robustos de células T 5/127.

- 5 El clon de células T 5/127 se tiñó como se ha descrito anteriormente con las construcciones de moléculas MHC 1, 2 y 3 de la invención. Como se muestra en la Figura 25B, todos los tamaños de las moléculas vehiculares de dextrano facilitaron una tinción dependiente de la dosis del clon de células T específico de MART-1. En comparación, la construcción mayor (la molécula vehicular dextrano 500 kDa) se unió más eficientemente a las células T que la construcción intermedia (molécula vehicular dextrano 270 kDa) y la construcción menor (molécula vehicular dextrano 150 kDa). Sin embargo, como es evidente a partir de la tinción dependiente de la dosis de las células mostrada en la Figura 25A, las tres construcciones tiñeron el clon de células T 5/127 más eficientemente de lo que lo hicieron los tetrámeros que tuvieron que ser añadidos en cantidades mayores para obtener una tinción significativa de las células (comparar la Figura 25A (cuadrados abiertos) con las tres curvas de la Figura 25B). La avidéz de unión mejorada de las tres construcciones de la invención se reflejó claramente por las bajas concentraciones de las construcciones (2-10 nM) requeridas para saturación mitad de la máxima, mientras los tetrámeros correspondientes requirieron 20-30 nM para saturación mitad de la máxima (véase la tinción de tetrámero en la Figura 25A).

Así, se concluyó que las construcciones de la invención se unieron de manera dependiente de la dosis a células T específicas de epítipo peptídico y con mayor avidéz que los tetrámeros correspondientes que presentaban péptidos idénticos.

20 EJEMPLO 4

Unión de construcciones de moléculas MHC de la invención y tetrámeros a línea de células T específica de influenza

En este experimento, se investigó la unión de construcciones específicas de péptido de la invención y tetrámeros a una línea de células T que reconoce un péptido no propio convencional presentado en el contexto de moléculas HLA A0201.

- 25 Se generaron células dendríticas (DC) a partir de PBMC recién aisladas de donantes HLA-A0201 según protocolos estándar, usando 250 U/ml rhIL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU) y 500 U/ml hrGM-CSF (Leucomax, Novartis/Schering-Ploug, Basilea, Suiza) para el cultivo de DC y 72 horas de exposición a hrCD40LT, 1 µg/ml (Immunex Corporation, Seattle, Washington, EEUU) para inducir la maduración de DC.

- 30 En el día 10 de cultivo, se aislaron las DC por tratamiento con EDTA y se cargaron con el péptido influenza IMP 58-66 (40 µg/ml) durante 1 hora seguido de lavado e irradiación (3.000 Rad). Posteriormente, se añadieron PBMC autólogas recién aisladas (2×10^6 /ml) a las DC cargadas con péptido ($1-2 \times 10^5$ /ml) en placas de 24 pocillos en 1 ml medio AB/pocillo que contenía 20 U/ml rhIL-4 y 5 ng/ml rhIL-7 (Preprotech EC, Londres, Reino Unido). Después de 9-11 días, los cultivos de células T se deplecionaron para células CD4⁺ por separación Dynabead[®] (según las instrucciones del fabricante) y las células CD8⁺ seleccionadas negativamente (4×10^5 /ml) se re-estimularon con DC irradiadas autólogas pulsadas con péptido ($1-2 \times 10^5$ /ml) y PBMC autólogas (10^6 /ml) irradiadas (3.000 Rad) en medio AB suplementado con rhIL-4 y rh-IL-7 en placas con fondo en U de 96 pocillos. Se realizaron re-estimulaciones adicionales cada 7^o día de cultivo como se ha descrito anteriormente usando células EBV-B HLA-A2⁺ pulsadas con péptido (2×10^5 /ml) irradiadas (6.000 Rad) como estimuladores y PBMC alogénicas irradiadas (3.000 Rad). Se añadió rhIL-2 (20 U/ml, Proleukin, Chiron, CA, EEUU) en el día 1 después de cada re-estimulación.

- 40 Se usaron las siguientes construcciones de moléculas MHC de la invención:

Construcción de moléculas MHC 4,

Construcción de moléculas MHC 5,

Construcción de moléculas MHC 6.

Se usaron los siguientes tetrámeros:

- 45 Tetrámero 3,

Tetrámero 4,

Tetrámero 5.

Los tetrámeros 3-5 se usaron para comparación.

- 50 Se incubaron 5×10^5 células T en 50 µl tampón FACS (PBS, 10 mg/ml BSA, 0,2% azida) con las construcciones de moléculas MHC poli-ligando de la invención o los tetrámeros, todos presentando péptidos de interés.

Las células se incubaron durante 90 minutos a 22⁰C en dosis graduales de las construcciones de la invención (0-32 nM, diluciones de 2 veces, véase la Figura 26) o los tetrámeros (0-112 nM, diluciones de 2 veces, véase la Figura 26), se lavaron una vez y se analizaron por citometría de flujo según procedimientos estándar de citometría de flujo para construcción de molécula y tetrámero unido a célula, respectivamente.

- 5 Como se muestra en la Figura 26, la fracción de células T específicas de péptido (aproximadamente 55%) en la línea celular establecida se tiñó completamente usando bajas concentraciones de las construcciones de la invención (<30 nM), mientras los tetrámeros tiñeron las células menos eficientemente. Se obtuvo una tinción mitad de la máxima con aproximadamente 3 nM de las construcciones de la invención y 30 nM de los tetrámeros. Por el contrario, las construcciones de la invención y los tetrámeros que expresaban péptido P53 de tipo salvaje no tiñeron las células T. Así, se concluyó que las construcciones de la invención tiñeron sub-poblaciones de células T específicas de influenza específicamente y con una mayor eficacia que los tetrámeros con péptido idéntico. Como se ilustra en la Figura 25 y 26, la eficiencia mejorada de tinción se produjo por la mayor valencia molecular HLA de las construcciones comparado con los tetrámeros.

EJEMPLO 5

- 15 Dependencia del tiempo de la unión de la construcción de moléculas MHC y tetrámero

En este experimento, se mostró que la unión de construcciones de moléculas MHC de la invención pareció ser dependiente del tiempo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 27. Para comparación, se ensayaron en ensayos paralelos tetrámeros marcados con PE que presentaban los mismos péptidos que las construcciones de moléculas MHC usadas de la invención.

- 20 Se uso la siguiente construcción de moléculas MHC de la invención:

Construcción de moléculas MHC 1.

Se uso el siguiente tetrámero:

Tetrámero 1.

- 25 Brevemente, se incubaron 5x10⁵ clones de células T específicos de MART-1 (5/127) en 50 µl de tampón FACS (PBS, 10 mg/ml BSA, 0,2% azida) con las construcciones de moléculas MHC poli-ligando de la invención o los tetrámeros, todos presentando péptidos de interés. Los clones de células T se incubaron en dosis graduales (diluciones de 2 veces, véase la Figura 27) de la construcción de la invención o el tetrámero, ambos presentando el análogo del péptido relacionado con MART-1 ELAGIGILTV. Las células se incubaron a temperatura ambiente (22⁰C). Se tomaron alícuotas de las células a diferentes puntos de tiempo (véase la Figura 27) se lavaron y midieron por citometría de flujo según procedimientos estándar para citometría de flujo para construcción (mostrada en la Figura 27B) o tetrámero (mostrado en la Figura 27A) unidos a células. Como se muestra en la Figura 27A, en el caso del tetrámero, se obtuvo una unión de estado estacionario después de 1 hora de incubación usando altas concentraciones de tetrámero (112 nM), mientras menores concentraciones (14-56 nM) no alcanzaron el estado estacionario en el intervalo de tiempo medido. En comparación, la construcción de la invención alcanzó un nivel de estado estacionario en los 60 minutos usando una concentración significativamente menor de construcción (16 nM).

Así, se demostró que la asociación de las construcciones de la invención fue más rápida que la asociación de los tetrámeros, debido presumiblemente a una mayor valencia de las construcciones de la invención.

EJEMPLO 6

Disociación de construcciones de la invención unidas a células

- 40 En este experimento, se investigó la disociación de construcciones de la invención unidas a células.

Se uso la siguiente construcción de moléculas MHC:

Construcción de moléculas MHC 1.

- 45 Se incubaron clones de células T (5/127) con la construcción de la invención que presentaba el análogo del péptido relacionado con MART-1 ELAGIGILTV. Las células (5x10⁵) se incubaron 1 hora a 22⁰C y se lavaron una vez y se incubaron a 4⁰C, 22⁰C y 37⁰C, respectivamente, en tampón FACS (PBS, 10 mg/ml BSA, 0,2% azida) que contenía 50 nM anticuerpo monoclonal específico de CD8 para prevenir la re-unión de la construcción que se disociaba. A diferentes puntos de tiempo (0, 60, 90, 120 minutos, respectivamente), se tomaron alícuotas de las células, se lavaron y se analizaron para construcciones unidas a células por citometría de flujo según un protocolo estándar para citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 28. A 4⁰C, la vida media de la unión de la construcción fue aproximadamente 90 minutos, que se redujo hasta aproximadamente 50 y 30 minutos a 22⁰C y 30⁰C, respectivamente. La disociación bifásica de las construcciones de las células incubadas a 37⁰C indicó que tenía lugar algún grado de internalización de la construcción al interior de las células. Alternativamente, la

disociación bifásica podía explicarse con interacción compleja entre la construcción y contra receptores en la superficie de las células T a 37°C comparado con la unión de la misma construcción a temperaturas más bajas.

Así, se concluyó que la disociación de construcción unida a células era dependiente del tiempo y de la temperatura.

EJEMPLO 7

5 Unión de la construcción de la invención: el impacto de anticuerpos

En este experimento, se mostró que la unión a la superficie celular de las construcciones de la invención se ve afectada por anticuerpos monoclonales específicos de HLA Clase I que reaccionan con epítomos de HLA Clase I que se encuentran muy cerca del sitio de unión del péptido.

Se usó la siguiente construcción de moléculas MHC de la invención:

10 Construcción de moléculas MHC 1.

Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales:

BB7.2 (específico de HLA A0201), W6/32 (específico general de HLA A, B, C), BBM1 (específico de β_2m humano), y anti-células T humanas de ratón, CD8 Clon DK25 (DAKO No. de Código M0707) (anticuerpo (específico de CD8).

15 El clon de células T específico de MART-1 5/127 se incubó con una mezcla de 2 nM construcción que presentaba el epítomo peptídico relacionado con MART-1 con o sin 10 nM anticuerpo monoclonal (BB7.2, W6/32, BBM1 y específico de CD8, respectivamente) como se indica en la Figura 29A. Las células se incubaron durante 90 minutos a 22°C, se lavaron una vez y se analizaron por citometría de flujo según procedimientos estándar para construcción unida a células. Los anticuerpos monoclonales B7.1 y W6/32 que reaccionaban con epítomos que se encontraban muy cerca del sitio de unión a péptido de HLA A0201 inhibieron como se muestra en la Figura 29A la unión de la construcción hasta un nivel cercano al fondo (obteniéndose la señal de fondo incubando las células con 10 nM construcción marcada con FITC sin moléculas HLA).

20 Por el contrario, la presencia de anticuerpo monoclonal BBM1 que se unía a la cadena ligera de HLA Clase I, β_2m , no afectó la unión de la construcción.

25 En un experimento similar (véase la Figura 29B), se analizó el impacto de un anticuerpo monoclonal específico de CD8. Las células T (5/127) se incubaron durante 60 minutos a 22°C con la construcción de moléculas MHC 1 (véase la Figura 29A) y dosis graduales de anticuerpo 0-12 nM (véase la Figura 29B). Las células se lavaron y se analizaron por citometría de flujo según procedimientos estándar de citometría de flujo para construcción unida a células. El anticuerpo específico de CD8 inhibió fuertemente la asociación de la construcción a las células T, véase la Figura 29B, sugiriendo que las moléculas CD8 en las células T contribuyen significativamente a la unión de construcciones específicas de epítomo peptídico.

30 Así, se concluyó que la unión de la construcción podía bloquearse por anticuerpos que reaccionan con el sitio de unión de HLA Clase I (BB7.2 y W6/32) presentado por la construcción (impedimento estérico) y anti-célula T humana de ratón, CD8 Clon DK25 en las células T. Debe indicarse, sin embargo, que ninguno de los anticuerpos inhibidores usados en este estudio se añadió en cantidades saturantes.

35 EJEMPLO 8

Unión de las construcciones de la invención: El efecto de la proporción HLA Clase I:dextrano durante el proceso de ligación

En este experimento, se analizó el número más óptimo de moléculas HLA Clase I por molécula vehicular dextrano requerido para una unión a células máxima de las construcciones de moléculas MHC de la invención.

40 Se usaron las siguientes construcciones de moléculas MHC de la invención:

Construcción de moléculas MHC 1, sin embargo, con diferentes cantidades de HLA A0201, véase a continuación,

Construcción de moléculas MHC 2, sin embargo, con diferentes cantidades de HLA A0201, véase a continuación,

Construcción de moléculas MHC 3, sin embargo, con diferentes cantidades de HLA A0201, véase a continuación.

45 Se añadieron cantidades graduales de complejos HLA A0201 biotinilados recombinantes que presentaban el análogo del péptido MART-1 (ELAGIGILTV) a disoluciones individuales de las construcciones que comprenden moléculas vehiculares dextrano con diferentes tamaños moleculares, concretamente moléculas vehiculares dextrano 150, 270 y 500 kDa, respectivamente. Más específicamente, se incubó una disolución 80 nM de dextrano 500 kDa (conjugado con 14 SA, cada uno marcado de media con 2 FITC) en tampón FACS (PBS, 10 mg/ml BSA, 0,2% azida) con un exceso de 88 (7.040 nM HLA A0201), 44 (3.520 nM) y 14 (1.121 nM) veces de complejos HLA A0201 mono-biotinilados, respectivamente. La mezcla de reacción se incubó 60 minutos a 22°C para obtener estado

50

- estacionario entre HLA A0201 y las moléculas SA conjugadas con el dextrano. A partir de las proporciones de HLA A0201 y dextrano (88, 44, 14 moléculas HLA a una molécula de dextrano) pudieron calcularse las proporciones de HLA a SA durante la ligación correspondientes a 6,5, 3,25 y 1, respectivamente. Debido a la alta afinidad de SA y MHC biotinilada, se esperaba que la ligación entre HLA A0201 y SA por dextrano resultaba en construcciones de moléculas MHC completamente saturadas (exceso de 88 veces de HLA), casi saturadas (exceso de 44 veces de HLA) y parcialmente saturadas (exceso de 14 veces de HLA). Asumiendo 4 sitios de unión por SA, las construcciones de moléculas están así cargadas con 54,4, 44,2 y 14,1 moléculas de HLA A0201 por dextrano. Las disoluciones se diluyeron 4 veces (concentración final de la construcción de moléculas MHC de 20 nM) antes del uso para tinción de células T por citometría de flujo según un protocolo estándar.
- 5
- 10 En un procedimiento similar, una preparación 145 nM SA/dextrano (270 kDa, 7 SA por dextrano, cada SA marcado de media con 2 FITC) se ligó con HLA A0201 biotinilado. Las concentraciones de HLA A0201 usadas para el proceso de ligación fueron un exceso de 48,5, 24,2 y 8,1 veces de la concentración de dextrano. La proporción de HLA:SA pudo calcularse a 7, 3,5 y 1,1, respectivamente. Asumiendo 4 sitios de unión por SA, las construcciones de moléculas están así cargadas con 27,6, 24,2 y 7,6 moléculas de HLA A0201 por dextrano. Las disoluciones se diluyeron hasta 20 nM antes de la tinción de células T según un procedimiento estándar.
- 15
- 20 En un procedimiento similar, una preparación 244 nM SA/dextrano (150 kDa, 4,4 SA por dextrano, cada SA marcado de media con 2 FITC) se ligó con HLA A0201 biotinilado. Las concentraciones de HLA A0201 usadas para el proceso de ligación correspondieron a un exceso de 28,8 (7.040 nM HLA A0201), 14,4 (3.520 nM HLA A0201) y 7,2 (1.760 nM HLA A0201) veces de la concentración de dextrano. La proporción de HLA:SA pudo calcularse a 6,5, 3,3 y 1,6, respectivamente. Asumiendo 4 sitios de unión por SA, las construcciones de moléculas estaban así cargadas con 17,6, 14,5 y 7,0 moléculas de HLA A0201 por dextrano. Las disoluciones se diluyeron hasta 20 nM antes de la tinción de células T según un procedimiento estándar.
- 25
- Los clones de células T se incubaron durante 60 minutos a 22°C antes de la tinción del clon de células T (5/127). Los clones de células T se incubaron 60 minutos a temperatura ambiente con disoluciones 20 nM de las construcciones de moléculas MHC cargadas con diferentes cantidades de HLA A0201. Las células se lavaron posteriormente una vez y se analizaron para construcción unida a células por citometría de flujo según un procedimiento estándar de citometría de flujo. Todas las construcciones se unieron como se esperaba específicamente al clon 5/127 (resultados mostrados en la Figura 30).
- 30
- La construcción que comprende las moléculas vehiculares dextrano mayores (500 kDa) se conjugó- de media- con 13,6 moléculas de estreptavidina con un número teórico de sitios de unión para moléculas HLA biotiniladas de aproximadamente 54 por molécula de dextrano (asumiendo 4 sitios de unión a biotina por SA). En comparación, la construcción que comprende las moléculas vehiculares dextrano 270 kDa y 150 kDa se conjugaron con 6,9 y 4,4 moléculas de estreptavidina por dextrano, respectivamente, con un número teórico de sitios de unión de biotina correspondiente a 42 y 17 moléculas HLA Clase I biotiniladas, respectivamente.
- 35
- 40 Como se muestra en la Figura 30, las construcciones que comprende la molécula vehicular dextrano 500 kDa se unieron óptimamente a las células T cuando se cargaban con un total de 44 moléculas HLA Clase I por molécula vehicular dextrano. En comparación, las construcciones que comprenden las moléculas vehiculares dextrano 270 y 150 kDa, respectivamente, se unieron óptimamente cuando se cargaron con un total de 24,2 y 14,5 moléculas HLA Clase I por dextrano (correspondiente a aproximadamente 4 moléculas HLA unidas por SA, respectivamente). La densidad observada de HLA Clase I/dextrano correspondió bien con 4 moléculas HLA Clase I/molécula SA conjugado con la molécula de dextrano. La reducción observada de la tinción de células T usando las construcciones de moléculas MHC generadas en exceso de moléculas HLA pudo deberse a la inhibición por moléculas monoméricas HLA no unidas. Así, se concluyó que las construcciones de moléculas MHC de la invención se unían óptimamente a células T específicas de péptido cuando todos los sitios de unión a biotina disponibles de la molécula vehicular estaban saturados durante el proceso de ligación. El exceso de molécula MHC monomérica no unida inhibió, sin embargo, la interacción entre construcciones de moléculas MHC y TCR específicos. Así, el proceso de ligación debería realizarse, consecuentemente, con una proporción 1:1 de moléculas MHC a sitios de unión.
- 45

EJEMPLO 9

Unión de construcciones de moléculas MHC y tetrámeros a pequeñas poblaciones de células T

- 50 En este experimento, se mostró que la unión de construcciones de moléculas MHC de la invención proporcionó una detección mejorada de poblaciones menores de células T específicas comparado con los tetrámeros.

Se usó la siguiente construcción de moléculas MHC de la invención:

Construcción de moléculas MHC 1.

Se usó el siguiente tetrámero:

Tetrámero 1.

El tetrámero se usó para comparación.

5 Los clones de células T 5/127 que reconocen el análogo del péptido de MART-1 y 5/130 que reconoce el péptido de gp100, respectivamente, se mezclaron en una proporción de 1:20 clon de células T 5/127 a clon de células T 5/130 y se usaron para análisis de construcciones de moléculas MHC de la invención y tetrámeros. El tetrámero se usó en una concentración 5 veces mayor para compensar la menor avidéz de unión (véanse los descubrimientos del Ejemplo 3) comparado con la de moléculas MHC poli-ligando correspondientes respecto al péptido de la invención (véanse las Figuras 25 y 26).

10 La disolución de células se incubó con 3 nM construcción de moléculas MHC ó 15 nM tetrámero durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez y se analizaron por citometría de flujo según procedimientos estándar de citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 31, tanto la construcción de la invención como el tetrámero tiñeron aproximadamente el 5% de las células correspondientes a la subpoblación de clones de células T 5/127 específicas de MART-1. La tinción de las células por la construcción de la invención proporciono, sin embargo, una distinción clara entre células T positivas y negativas.

15 En comparación, la tinción por le tetrámero proporcionó una distinción menos clara entre las dos poblaciones de células T, véase la Figura 31.

Consecuentemente, se concluyó que las construcciones de la invención proporcionan una mejor tinción, así, una capacidad mejorada de detección por citometría de flujo de poblaciones menores de células T en comparación con los tetrámeros de la técnica anterior.

20 EJEMPLO 10

Las construcciones de moléculas MHC vacías de péptido pre-formadas se unen a células T específicas después de cargarlas con péptidos apropiados

25 La capacidad sorprendente y sensible de las construcciones de moléculas MHC de la invención en la detección de pequeñas especificidades de células T (véase el Ejemplo 9) en muestras de células mixtas se investigó adicionalmente usando muestras que contienen aproximadamente 1% del clon de células T 5/127 ("clon de células T de alta avidéz", véase la Figura 25) y 1% 5/130 ("clon de células T de baja avidéz", véase la Figura 25). El porcentaje de 1 se eligió ya que una variedad de estudios han mostrado que una sub-población de células T proliferativas comprende frecuentemente aproximadamente 1% del número total de células T en muestras de sangre y en un intervalo de 0,1 a 10% en pacientes inmuno respondedores.

30 Se generó la siguiente construcción de moléculas MHC vacía de péptido de la invención a partir de la construcción de moléculas HLA A0201 vacía de péptido de la invención:

Construcción de moléculas MHC 7.

También, se usó la construcción de moléculas MHC 1 y la construcción de moléculas MHC 8.

En este experimento, se generó además una construcción de moléculas HLA A0201 específica de péptido.

35 El tetrámero siguiente se produjo a partir de HLA A0201 vacía de péptido ligada a estreptavidina marcada con PE:

Tetrámero 6.

También se usaron el tetrámero 1 y tetrámero 2.

40 La construcción de moléculas HLA vacía de péptido de la invención se formó por incubación de 60 pmoles de cadena pesada mono-biotinilada (2 µl de disolución madre con 30 µM molécula de cadena pesada obtenida como se describe en el Ejemplo 1.C.) con 1 nmol de β₂m en 198 µl de tampón de dilución (20 mM tris, pH 6,8, 150 nM NaCl) durante 2 horas a 18^oC. El dímero formado (aproximadamente 270 nM) era estable en este tampón durante varios días cuando se almacenó a 4^oC. La construcción de moléculas HLA vacía de péptido de la invención se formó por la adición de moléculas vehiculares estreptavidina dextrano (500 kDa, 13,6 SA/dextrano, añadido a una concentración final de 10 nM) a 100 µl de disolución.

45 La construcción de moléculas HLA que presenta péptido (construcción 1) se formó añadiendo el análogo del péptido MART-1 ELAGIGILTV a la disolución de dímeros HLA y moléculas de dextrano a una concentración final de 10 µM e incubando toda la noche a 18^oC.

En una estrategia similar, la construcción de moléculas MHC 8 de la invención que presenta un péptido gp100 se generó por la adición de péptido KTWGQYWOV.

50 Los tetrámeros se generaron en una estrategia similar excepto que se añadió SA marcado con PE secuencialmente a una concentración final de 70 nM, para asegurar una proporción de 1:4 entre moléculas SA y HLA, antes de la

adición del análogo del péptido MART-1 ELAGIGILTV o péptido gp100 KTWGQYWVOV. El tetrámero se usó para comparación.

5 Antes de la tinción, las disoluciones con construcciones de moléculas MHC de la invención y los tetrámeros se diluyeron dos veces en tampón FACS descrito anteriormente que contenía 2 mg/ml BSA y 0,2% azida. Las concentraciones de molécula de las construcciones y los tetrámeros usados para la tinción de las células T fueron así 5 y 35 nM, respectivamente.

10 Los dos clones de células T 5/127 y 5/130, respectivamente, se mezclaron en proporciones de 1:100, es decir, una muestra de células contenía aproximadamente 1% 5/127 y 99% 5/130 de células T y otra muestra de células contenía 1% 5/130 y 99% 5/127. Las disoluciones de células mixtas se ensayaron para unión de construcción de la invención o tetrámeros que presentaban péptidos reconocidos por el 1% de subpoblaciones de células T.

Para citometría de flujo, las células (5×10^5) se centrifugaron a 300g durante 5 minutos, y se re-suspendieron en 50 μ l de disolución con la construcción de moléculas MHC de la invención o tetrámero y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron una vez e inmediatamente se analizaron por citometría de flujo según procedimientos estándar.

15 Como se muestra en la Figura 32, la construcción que presentaba el péptido MART-1 (ELAGIGILTV) de la invención proporcionó una distinción clara entre células T positivas (1,2% células teñidas positivamente) mientras la construcción que presentaba el péptido gp100 (KTWGQYWVOV) tiñó aproximadamente 0,4%. Aunque utilizados a concentraciones 7 veces mayores ninguno de los tetrámeros correspondientes fueron capaces de teñir las células T (datos no mostrados).

20 Así, se concluyó que era de hecho posible generar construcciones de moléculas MHC vacías de péptido de la invención. Mediante el cargado posterior con péptidos apropiados, las construcciones de moléculas MHC resultantes fueron capaces de teñir poblaciones menores de células T. A diferencia de los tetrámeros, las construcciones de moléculas MHC de la invención fueron reconocidas tanto por los clones de células T de baja como alta avidéz usando citometría de flujo.

25 EJEMPLO 11

Unión de construcción de moléculas MHC radio-marcada que presenta el péptido MART-1

30 En este experimento, se investigó la unión a células de una construcción de moléculas MHC radio-marcada de la invención. La construcción de moléculas comprendía como molécula MHC, complejos HLA/péptido plegados en presencia de β_2m yodada. La construcción se preparó según el Ejemplo 1, sin embargo, teniendo lugar el plegamiento en presencia de β_2m yodada.

Se usó la siguiente construcción de moléculas MHC de la invención:

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehicular dextrano 500 kDa que tiene unida a él 27,2 cadena pesada HLA A0201 en complejo con el análogo del péptido MART-1 (ELAGIGILTV) y β_2m yodada mediante 13,6 SA.

35 Las β_2m se yodaron según procedimientos estándar y se usaron para el plegamiento de cadena pesada completamente biotinilada y activa como se ha descrito anteriormente (véase el Ejemplo 1.C.). El complejo generado de novo HLA A0201 que comprende péptido, cadena pesada y una molécula β_2m radio-marcada se purificó del exceso de β_2m y péptido por cromatografía G50 según un protocolo estándar. La radiactividad se contó usando un contador gamma COBRA antes de ligación de los complejos HLA A0201 purificados a dextranos conjugados con SA.

40 Las muestras de clones de células T 5/127 y 5/130 (5×10^5) específicos de MART-1 o gp100 en 100 μ l PBS con 1% BSA, se incubaron con la construcción de moléculas MHC radio-marcada de la invención (100.000 cpm/muestra a 18°C durante 1 hora con o sin la variedad de anticuerpos como se describe en el Ejemplo 7. Las células se lavaron 5 veces y se transfirieron a tubos frescos antes del recuento de radiactividad unida a las células.

45 Como se muestra en la Figura 33, las células T 5/127 unieron construcción de moléculas MHC radio-marcada de la invención (construcción de moléculas MHC 1), mientras el clon de células T específico de péptido gp100 5/130 no unió, como se esperaba.

Además, se observó que los anticuerpos BB7.2 y W6/32 pero no BBM1 inhibieron la unión de la construcción de la invención de acuerdo con los descubrimientos del Ejemplo 7.

50 Así, se concluyó que las construcciones de moléculas MHC de la invención que comprenden una β_2m radio-marcada eran capaces de unirse a células T específicas. Además, la unión de este tipo de construcción de moléculas MHC marcada era comparable con la unión de construcciones de moléculas MHC marcadas de forma diferente.

Otra característica importante fue que el marcaje de β_2m representa en este contexto una alternativa versátil al marcaje de la cadena pesada o el péptido, ya que β_2m es una subunidad común, lo que facilita el plegamiento de una variedad de diferentes moléculas HLA.

EJEMPLO 12

5 Tinción de células T específicas de tumor

En este ejemplo, se ensayó la capacidad de construcciones de moléculas MHC poli-ligando para marcar células T específicas en lesiones de cáncer de mama. El ensayo se realizó en biopsias fijadas con acetona, congeladas de piel humana, nódulos linfáticos y lesiones tumorales, respectivamente, montadas en portaobjetos.

Se usaron las siguientes construcciones de moléculas MHC:

10 Construcción de moléculas MHC 8

Construcción de moléculas MHC 11.

15 En la Figura 38, se muestra la tinción de células T específicas en biopsias positivas para HLA A2 tomadas de lesiones de cáncer de mama. La tinción se realizó por construcciones de moléculas MHC poli-ligando (500 kDa) que presentaban una cantidad máxima de HLA-A0201 en asociación con el análogo de péptido (SUR1M2) (LMLGEFLKL) de survivina, un antígeno asociado a tumor identificado recientemente.

El tejido congelado se seccionó y se recogió en portaobjetos de vidrio (Superforst Plus Gold Slides, Erie Scientific Co, Portsmouth, New Hampshire), se secó al aire toda la noche y se fijó en acetona fría durante 5 minutos.

20 Todas las etapas del procedimiento siguientes se realizaron a temperatura ambiente y en oscuridad. Entre cada etapa, los portaobjetos se lavaron 3 veces 10 minutos con un tampón de Disolución Salina Tamponada con Fosfato (PBS) (pH 7,6).

25 Los portaobjetos se incubaron en primer lugar (45 minutos) con (i) el anticuerpo primario; anti-CD8 (clon anti-CD8, HIT8a, No cat. 550372, Pharmigen, San Diego, CA; EEUU, dilución 1:100 en tampón PBS), seguido de (ii) anti-ratón de cabra conjugado con Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, EEUU, diluido 1:500 en PBS) durante 45 minutos y finalmente (iii) se incubó con la construcción de moléculas MHC poli-ligando durante 75 minutos (100 μ ml, 20 10^{-9} M construcción en PBS).

Finalmente, los portaobjetos teñidos se montaron con cubreobjetos de vidrio en disolución anti destañido (Vectashield, Vector labs, Burlingame, CA, EEUU) y se mantuvieron en la nevera hasta el análisis bajo microscopio confocal.

30 La población completa de TILS citotóxicos en biopsias tumorales pudo visualizarse por anticuerpos específicos anti-CD8 conjugados con Cy3 (Figura 25, carriles izquierdos) mientras os clones de células T específicos de SUR1M2 pudieron visualizarse con la construcción de moléculas MHC poli-ligando conjugada con FITC (carril derecho en la parte superior). La doble tinción de células T positivas para CD8 y específicas de epítipo peptídico se reveló en las fotografías fusionadas en los carriles del centro (parte superior). Otros péptido de unión HLA A0201, el antígeno gp100 asociado a melanoma presentado por la construcción de moléculas MHC, no tiñó TILS en el tejido de cáncer

35 de mama examinado (carril derecho, centro). En un segundo control, la construcción de moléculas MHC poli-ligando SUR1M2 no tiñó células T en biopsias de cáncer de mama de pacientes negativos para A2 (parte derecha, inferior).

Así, se concluyó que la molécula MHC poli-ligando específica de péptido se unía específicamente a una población de células T sutil diana y así permitió el análisis *in situ* de la expresión de células T en biopsias de pacientes con cáncer de mama.

40 EJEMPLO 13

Tinción *in situ* de tejidos de melanoma y nódulo linfático con construcción de moléculas MHC poli-ligando SUR1M2

En este ejemplo se ensayó la capacidad de construcciones de moléculas MHC poli-ligando para teñir células T específicas en tejido de melanoma y nódulo linfático de material de pacientes positivos para HLA-A2.

Se usó la siguiente construcción de moléculas MHC:

45 Construcción de moléculas MHC 11.

Los detalles experimentales de este Ejemplo son similares a los proporcionados en el Ejemplo 12 excepto que el tejido se originó de un paciente con melanoma.

En la Figura 39, el carril izquierdo muestra la tinción de Cy-3 de células T CD8+ en muestras de tejido de tumor (parte superior) y nódulo linfático (parte inferior). El carril derecho muestra la tinción localizada por la construcción de

moléculas MHC A2-SUR1M2 FITC. La doble tinción de células T positivas para CD8 y específicas del péptido SUR1M2 se representa en el carril central mostrando las fotografías fusionadas.

En conclusión, se mostró que podía detectarse la unión específica *in situ* de construcción de moléculas MHC poli-ligando que presenta péptido SUR1M2 a células T CD8+ en biopsias de lesiones de melanoma y nódulos linfáticos.

5 EJEMPLO 14

Tinción *in situ* de células T CD8+ en tejido de melanoma con construcción de moléculas MHC poli-ligando que presenta péptido MART-1

En este ejemplo se investigó la tinción específica de tejido de melanoma de un paciente positivo para HLA-A0201 por una construcción de moléculas MHC A2-MART-1.

10 Se usó la siguiente construcción de moléculas MHC:

Construcción de moléculas MHC 1.

Los detalles experimentales de este Ejemplo fueron similares a los proporcionados en el Ejemplo 12, excepto que el tejido fue de un paciente con melanoma y que la construcción de moléculas MHC poli-ligando presentaba el análogo del péptido MART-1 (ELAGIGILTV).

15 El resultado de la tinción experimental de una biopsia de melanoma se proporciona en la Figura 40. La fotografía de la izquierda muestra la localización de células positivas para CD-8 teñidas con PE y la fotografía de la derecha la presencia de células T específicas de MART-1 teñidas con FITC. Las células positivas para MART-1/CD-8 doblemente teñidas se observan en la fotografía del centro fusionada.

20 En conclusión, usando una estrategia similar al Ejemplo 12, se mostró que podía detectarse *in situ* la unión específica de construcción de moléculas MHC poli-ligando que presenta el análogo del péptido MART-1 (ELAGIGILTV) a células T CD8 en una lesión de un paciente con melanoma positivo para HLA A0201.

EJEMPLO 15

Tinción *in situ* de células T reactivas para BV12 y no reactivas en biopsias de piel de sitios de inyección usando construcciones de moléculas MHC poli-ligando que presentan el péptido MART-1 y MAGE-3

25 Los intentos para desarrollar terapia inmune curativa comprenden estrategias en las que se inyectan candidatos peptídicos solubles, por ejemplo, SUR1M2 y/o células dendríticas (DC) cargadas con péptidos o lisados tumorales en el paciente. Mientras las respuestas inmunes celulares se inician por la interacción de células T y células presentadoras de antígeno, por ejemplo, DC en órganos linfoides secundarios, las vacunaciones terapéuticas pueden dar lugar a otro escenario, concretamente la expansión local y acumulación de células T específicas de antígeno. Usando construcciones de moléculas MHC poli-ligando que presentan péptidos asociados a tumores, se investigó si células T específicas de péptido están sobre-representadas en el sitio de inyección.

30 Se usaron las siguientes construcciones de moléculas MHC:

Construcción de moléculas MHC 1

Construcción de moléculas MHC 14.

35 Usando una estrategia experimental similar a la usada en el Ejemplo 12 se realizaron análisis *in situ* de doble tinción con anticuerpo TCR VB12 marcado con Cy-3 y construcciones de moléculas MHC poli-ligando marcadas con FITC que presentan el péptido MART-1 o MAGE-3 en biopsias de piel de sitios de inyección. El anticuerpo TCR VB12 sólo reacciona con un subconjunto de las células T y es específico para los receptores de células T que expresan la región 12 de la familia de cadena β variable.

40 Los resultados se muestran en la Figura 41. Los carriles izquierdos revelan tres poblaciones distintas de células T. Las poblaciones incluyen una reactiva para BV12-/MART-1 (A), reactiva para BV12+/MART-1 (B) así como células no reactivas para BV12+/MART-1 (C). Así, pudo excluirse una interacción no específica de construcción de moléculas MHC poli-ligando MART-1/HLA A0201 con todos los miembros de la familia BV12. Además, las células que reconocen el péptido MAGE-3 se encontraron en pequeñas agrupaciones, lo que sugiere una expansión local de esta especificidad de células T (D).

45 Así, en conclusión, usando las construcciones de moléculas MHC poli-ligando que reconocen células T específicas fue posible demostrar la presencia *in situ* de poblaciones de células T específicas en el sitio de inyección 48 horas después de la inyección s.c. de DC pulsadas con lisado tumoral lo que sugiere una expansión local de células T específicas de antígeno.

50

EJEMPLO 16

Tinción in situ de células T reactivas CD8 en biopsias de piel de sitio de inyección usando construcciones de moléculas MHC poli-ligando que presentan péptido gp-100 y MAGE-3

5 En este experimento se investigó adicionalmente la acumulación de células T específicas de antígeno peptídico usando la misma estrategia que en el Ejemplo 15.

Se usaron las siguientes construcciones de moléculas MHC:

Construcción de moléculas MHC 8

Construcción de moléculas MHC 14.

10 Los resultados experimentales se muestran en la Figura 42. Los carriles izquierdo y central muestran la tinción con anticuerpos anti-CD8 y poli-ligandos específicos de péptido, respectivamente. Las fotografías fusionadas se muestran en el carril derecho.

Se concluyó que la inmunización de pacientes con DC pulsadas con un epítipo de péptido gp100 dio lugar a la infiltración de células T específicas que reconocían el péptido presentado por la construcción de moléculas MHC poli-ligando HLA A0201 (Figura 42B) pero no un epítipo MAGE-3 (Figura 42A).

15 EJEMPLO 17

Tinción con cromógeno in situ de células T CD8+ en tejido de melanoma con construcción de moléculas MHC poli-ligando que presenta péptido MART-1

20 Se estudió si la unión específica de construcción de moléculas MHC poli-ligando que presenta el análogo del péptido MART-1 (ELAGIGILTV) a células T CD8 en una lesión de un paciente con melanoma positivo para HLA A0201, podía visualizarse por tinción con cromógeno mediada por HRP usando dos métodos de bloqueo de peroxidasa diferentes.

Se usó la siguiente construcción de moléculas MHC:

Construcción de moléculas MHC 13.

25 Las lesiones de melanoma congeladas se seccionaron (5 µm) y se recogieron en portaobjetos de vidrio (Superfrost® Plus Gold Slides, Erie Scientific Co, Portsmouth, New Hampshire), se secaron al aire durante 30 minutos y se fijaron en acetona de grado reactivo anhidra fría (Aldrich, Milwaukee, WI, EEUU) durante 5 minutos.

Todas las etapas siguientes del procedimiento se realizaron a temperatura ambiente. Entre cada etapa los portaobjetos se lavaron en lotes 3 veces 10 minutos con un tampón PBS (pH 7,6).

La peroxidasa endógena se bloqueó según dos diferentes estrategias de reactivo:

30 Una disolución peróxido/metanol (50 ml 3% H₂O₂ más 200 ml metanol) (Figura 43A) o disolución bloqueante de peroxidasa (código S2023, DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca) (Figura 43B).

Después de lavar, los portaobjetos se incubaron durante 30 minutos con las construcciones indicadas HLA-péptido dextrano 270 HRP (100 ml, 2,9, 10⁻⁹ M en PBS).

35 Después de dos lavados, los complejos unidos se visualizaron usando sustrato 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (DAKO AEC Substrate System, DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca). La reacción se terminó después de 25 minutos.

Los portaobjetos se contra tiñeron con hematoxilina de Mayer (Código S330930, DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca, 15 segundos) y se lavaron en tampón PBS hasta que fue ligeramente azul (aproximadamente 30 segundos). Finalmente, los portaobjetos se montaron con cubreobjetos usando Aquamont (DAKO Corporation, Carpintería, CA, EEUU) y se analizaron usando un microscopio de campo brillante (Zeiss) con capacidades fotográficas.

40 En conclusión, se consiguió una tinción exitosa independientemente de la estrategia usada para bloquear la peroxidasa endógena.

EJEMPLO 18

Activación de células T inducida por construcción de moléculas MHC: el impacto de moléculas co-estimuladoras

45 En este experimento, se mostró que la activación de clones de células T incubados con construcción MHC se ve afectada por la presencia de moléculas co-estimuladoras unidas a la construcción de moléculas MHC, que se unen a isoformas activadoras de NKR.

Se usaron las siguientes construcciones de moléculas MHC:

Construcción de moléculas MHC 15,

Construcción de moléculas MHC 16,

Construcción de moléculas MHC 17,

5 Construcción de moléculas MHC 18.

Las construcciones de moléculas MHC 17 y 18 se usaron como controles.

Se añadieron cantidades sub-óptimas de complejos recombinantes HLA A0201 biotinilado que presentan el análogo del péptido MART-1 (ELAGIGILTV) o el péptido gp100 (KTWGQYWQV) a una disolución de la construcción que comprende moléculas vehiculares dextrano 500 kDa. Más específicamente, se incubó una disolución 80 nM de dextrano (conjugado con 13,6 SA, cada uno marcado de media con 2 FITC) en PBS con 1.121 nM complejos mono-biotinilados HLA A0201 con o sin 510 nM proteína MIC A mono-biotinilada. Puede estipularse del Ejemplo 8 que las construcciones de moléculas que comprenden sólo complejos HLA se cargan con 14,1 moléculas HLA A0201 por dextrano. Las construcciones de moléculas que comprenden HLA y proteína MIC A se cargan con 14,1 moléculas HLA A0201 por dextrano y 7,1 moléculas MIC A por dextrano, respectivamente.

15 Los clones de células T 5/127 específicos de péptido MART-1/HLA A0201 (5×10^5) se crecieron en medio y se incubaron con 5 nM construcciones de moléculas que presentaban bien el péptido MART-1 o gp100 con o sin proteínas MIC A. Las células se incubaron durante 24 y 48 horas, respectivamente, a 37°C, antes de medir IFN-gamma en los sobrenadantes por ELISA según un procedimiento estándar.

20 Como se muestra en la Figura 44, la construcción que comprende HLA A0201 que presenta el péptido MART-1 combinado con o sin MIC A estimuló el clon de células T 5/127 para liberar IFN-gamma después de 24 horas, lo que sugiere que ambas construcciones eran capaces de unir e inducir alguna señalización. Por el contrario, sólo la construcción de moléculas que comprende HLA y MIC A fue capaz de estimulación adicional como se indica por la cantidad incrementada de IFN-gamma. En comparación, la liberación de IFN-gamma permaneció invariable por la estimulación de construcción de moléculas MHC que sólo comprende complejos péptido MART-1/HLA. Ninguna de las construcciones de moléculas MHC que presentan el péptido gp100 fue capaz de estimulación en este experimento (datos no mostrados).

30 Se concluyó que las construcciones de moléculas MHC que presentan péptido apropiado eran capaces de estimular células T después de unión a TCR específico de péptido (véanse las Figuras 25B y 30). Sin embargo, sólo las construcciones de moléculas que comprenden complejos péptido-HLA apropiados y proteína MIC A estimularon las células T después de una incubación prolongada. Esta característica puede explicarse por la inducción de anergia de células T cuando se estimulan con construcción de moléculas sin proteínas co-estimuladoras. Esta construcción fue capaz de estimulación inicial seguida de inactivación de las células T, que es una propiedad característica de anergia. La construcción de moléculas MHC con HLA y MIC A fue capaz de estimulación continua.

EJEMPLO 19

35 Preparación de moléculas vehiculares que tienen unidas a ellas una pluralidad de entidades de unión

Varias moléculas vehiculares (como se ejemplifica por dextranos 150, 270 y 500 kDa, respectivamente) que tienen unidas a ellas una pluralidad de entidades de unión (como se ejemplifica por estreptavidina (SA)) se prepararon según el procedimiento descrito mas adelante. Las moléculas MHC y/o compuestos biológicamente activos pueden unirse posteriormente. El numero teórico de sitios de acoplamiento a cada SA es 4, lo que significa que la capacidad de carga de cada molécula SA-dextrano es 22,4 (4x5,6), 41,2 (4x10,3) y 68 (4x17,0). Además, moléculas MHC/compuestos biológicamente activos pueden unirse a la molécula de dextrano directamente, haciendo así la capacidad de carga incluso mayor.

SA-dextrano (150, 270, 500 kDa)

45 Se dializó estreptavidina (SA, Genzyme) toda la noche (100 mg en 5 ml, frente a 1.000 ml de 0,10 M NaCl, 2-4°C, 10 kDa MwCO, cambiado tres veces). Después de medición de absorbancia UV se calculó la concentración.

50 La disolución de SA se añadió a una disolución de dextrano activado con vinilsulfona (aproximadamente 25% activado) de 150, 270 ó 500 kDa (en total 1,6 mg vinilsulfona dextrano/ml, 7,7 mg SA/ml, 0,1 M NaCl, 25 mM tampón carbonato, pH 8,5) y se agitó a 30°C durante 18 horas. Cualesquiera grupos reactivos remanentes se apantallaron por la adición de 1/10 volumen de mezcla de reacción de un tampón que contiene etanolamina (110 mM etanolamina, 50 mM HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,0) y se agitó durante 30 minutos a 30°C. Las moléculas poliméricas así obtenidas (SA-dextrano) se purificaron de SA no unido por filtración en gel (FPLC, Pharmacia, S-200, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,2).

El grado de incorporación de SA por molécula de dextrano se calculó a partir de la absorbancia UV a 278 nm. La incorporación de SA fue de media 5,6 (para el dextrano 150 kDa), 10,3 (para el dextrano 270 kDa) y 17,0 (para el dextrano 500 kDa), respectivamente. Las moléculas se concentraron hasta el equivalente de 3,0 mg SA/mL usando un dispositivo de centrifuga de filtro Millipore.

5 EJEMPLO 20

Preparación de moléculas vehiculares que tienen unidas a ellas una pluralidad de entidades de unión marcadas

Mediante los procedimientos descritos a continuación, se prepararon varias moléculas vehiculares (como se ejemplifica por dextranos 150, 270 y 500 kDa, respectivamente) que tienen unidas a ellas una pluralidad de entidades de unión (como se ejemplifica por estreptavidina (SA)) marcadas con una pluralidad de compuestos marcadores (como se ejemplifica por Alexa 647). Las moléculas MHC y/o los compuestos biológicamente activos pueden unirse posteriormente. El número teórico de sitios de acoplamiento a cada SA es 4, lo que significa que la capacidad de carga de cada molécula SA-dextrano es 22,4 (4x5,6), 41,2 (4x10,3) y 68 (4x17,0). Además, las moléculas MHC/los compuestos biológicamente activos pueden unirse a la molécula de dextrano directamente, haciendo así la capacidad de carga incluso mayor.

15 SA-Dextrano (150, 270, 500 kDa) marcado con Alexa 647

Las moléculas SA dextrano obtenidas del Ejemplo 19 se marcaron con Alexa 647 según las directrices generales proporcionadas por el fabricante del Kit marcador de Proteína Alexa Fluor 647 (Molecular Probes, número de producto A-20173). Las condiciones de la reacción fueron 1 vial Alexa 647, 2,0 mg SA/mL, 0,10 M NaCl, 50 mM carbonato, pH 8,0, 0,500 mL en volumen total, 30°C, en oscuridad durante una hora). Cualesquiera grupos reactivos remanentes se apantallaron por la adición de 0,050 mL de volumen de mezcla de reacción a un tampón que contiene etanolamina (110 mM etanolamina, 50 mM HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,0), y se agitó durante 30 minutos a 30°C. Las moléculas poliméricas marcadas fluorescentemente así obtenidas se purificaron de agentes de tinción no unido por diálisis (frente a 1.000 ml 0,10 M NaCl, 2-4°C, 10 kDa MwCO, cambiado tres veces), 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,2).

25 El grado de incorporación de SA por molécula de dextrano, y la incorporación de Alexa 647 por SA, así como la concentración de las moléculas se calcularon a partir de la absorbancia UV a 278 nm y 650 nm. A las moléculas se añadió azida sódica hasta 15 mM como un conservante. Los resultados se muestran a continuación.

Molécula dextrano	vehicular	SA por media)	dextrano (de	Alexa 647 por SA (de media)	Concentración de dextrano (mol/l)
150		5,6		2,7	60x10 ⁻⁸
270		10,3		2,6	50x10 ⁻⁸
500		17,0		2,7	20x10 ⁻⁸

EJEMPLO 21

Preparación de moléculas vehiculares que tienen unidas a ellas una pluralidad de entidades de unión

30 Mediante los procedimientos descritos a continuación, se prepararon varias moléculas vehiculares (como se ejemplifica por dextranos 150, 270 y 500 kDa respectivamente) que tienen unidas a ellas una pluralidad de entidades de unión (como se ejemplifica por anticuerpo anti-biotina de conejo). Las moléculas MHC y/o compuestos biológicamente activos pueden añadirse posteriormente si se desea.

Anti-biotina de conejo dextrano (150, 270, 500 kDa)

35 Se dializó anticuerpo anti-biotina de conejo (purificado por afinidad, Fab2, aproximadamente 100 kDa, DAKO número de código DM0069) toda la noche (100 mg anticuerpo en 5 ml, frente a 1.000 ml 0,10 M NaCl, 2-4°C, 10 kDa MwCO, cambiado tres veces). Después de la medición de absorbancia UV, se calculó la concentración. La disolución de anticuerpo se añadió a una disolución de dextrano activado con vinilsulfona (aproximadamente 25% activado) de 150, 270 ó 500 kDa (en total 0,680 mL, 1,07 mg vinilsulfona dextrano/ml, 15,25 mg anticuerpo/ml, 0,1 M NaCl, 25 mM tampón carbonato, pH 8,5), respectivamente, y se agitó a 30°C durante 18 horas. Cualesquiera grupos reactivos remanentes se apantallaron por la adición de 1/10 de volumen de mezcla reacción a un tampón que contiene etanolamina (110 mM etanolamina, 50 mM HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,0), y se agitó durante 30 minutos a 30°C. Las moléculas poliméricas obtenidas se purificaron de anticuerpo no unido por filtración en gel (FPLC, Pharmacia, S-200, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,2).

45 El grado de incorporación de anticuerpo por dextrano se calculó a partir de la absorbancia UV a 278 nm. El número de anticuerpos por dextrano fue de media 8,4 (para el dextrano 150 kDa), 19,5 (para el dextrano 270 kDa) y 34,4 (para el dextrano 500 kDa). Las moléculas se concentraron hasta el equivalente de 3,9, 3,4 y 3,4 mg anticuerpo/mL, respectivamente, usando un dispositivo de centrifuga de filtro Millipore.

En otra preparación usando las mismas condiciones, la incorporación de anticuerpos por dextrano fue 7,2 (para el dextrano 150 kDa) y 11,2 (para el dextrano 500 kDa). Estas moléculas se concentraron hasta el equivalente de 3,5 mg anticuerpo/mL respectivamente usando un dispositivo de centrifuga de filtro Millipore.

EJEMPLO 22

5 Preparación de moléculas vehiculares que tienen unidas a ellas una pluralidad de entidades de unión marcadas

Mediante los procedimientos descritos a continuación, se prepararon varias moléculas vehiculares (como se ejemplifica por dextranos 150 y 270 kDa, respectivamente) que tienen unidas a ellas una pluralidad de entidades de unión (como se ejemplifica por anticuerpo anti-biotina de conejo) marcadas con una pluralidad de compuestos marcadores (como se ejemplifica por Alexa 532 o Alexa 647). Las moléculas MHC y/o compuestos biológicamente
10 activos pueden unirse posteriormente si se desea.

Preparación de anti-biotina de conejo dextrano marcado con Alexa 532 ó 647

Las moléculas de anti-biotina de conejo dextrano obtenidas en el Ejemplo 21 se marcaron con Alexa 532 o Alexa 647 según las directrices generales proporcionadas por el fabricante del Kit marcador de Proteína Alexa Fluor 532 (Molecular Probes, número de producto A-10236) o Kit marcador de Proteína Alexa Fluor 647 (Molecular Probes,
15 número de producto A-20173). Las condiciones de la reacción fueron 1 vial de agente de tinción Alexa, equivalente de 2,0 mg anticuerpo/mL, 0,10 M NaCl, 50 mM carbonato, pH 8,0, 0,500 mL en volumen total, 30°C, en oscuridad durante una hora). Cualesquiera grupos reactivos remanentes se apantallaron por la adición de 0,050 mL de volumen de mezcla de reacción a un tampón que contiene etanolamina (110 mM etanolamina, 50 mM HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,0), y se agitó durante 30 minutos a 30°C. Las cuatro diferentes moléculas poliméricas marcadas
20 fluorescentemente se purificaron de agente de tinción no unido por diálisis (frente a 1.000 ml de 0,10 M NaCl, 2-4°C, en la oscuridad, 10 kDa MwCO, cambiado tres veces), 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,2).

El grado de incorporación de Alexa 532 por anticuerpo, y la incorporación de anticuerpo por dextrano, así como la concentración, se calcularon a partir de la absorbancia UV a 278 y 530 nm. A las moléculas se añadió azida sódica hasta 15 mM como un conservante.

25 El grado de incorporación de Alexa 647 por anticuerpo, y la incorporación de anticuerpo por dextrano, así como la concentración, se calcularon a partir de la absorbancia UV a 278 y 650 nm. A las moléculas se añadió azida sódica hasta 15 mM como un conservante.

Molécula dextrano	vehicular	Anticuerpo por dextrano (de media)	Alexa 532 por anticuerpo (de media)	Concentración de dextrano (mol/l)
150		8,4	3,0	165,5x10 ⁻⁸
270		19,5	2,9	69,4x10 ⁻⁸

Molécula dextrano	vehicular	Anticuerpo por dextrano (de media)	Alexa 647 por anticuerpo (de media)	Concentración de dextrano (mol/l)
150		7,21	2,7	150x10 ⁻⁸
270		11,2	2,6	65x10 ⁻⁸

EJEMPLO 23

30 Preparación de moléculas vehiculares que tienen unidas a ellas una pluralidad de entidades de unión marcadas

Mediante los procedimientos descritos a continuación, se prepararon varias moléculas vehiculares (como se ejemplifica por dextranos 150 y 270 kDa, respectivamente) que tienen unidas a ellas una pluralidad de entidades de unión (como se ejemplifica por anticuerpo anti-biotina de conejo) marcadas con una pluralidad de compuestos marcadores (como se ejemplifica por FITC). Las moléculas MHC y/o compuestos biológicamente activos pueden
35 unirse posteriormente si se desea.

Preparación de anti-biotina de conejo dextranos marcado con FITC

Los anti-biotina de conejo dextranos del Ejemplo 21 (dextranos 150 kDa y 270 kDa) se usaron para el marcaje con FITC. El vial de FITC (FITC (isotiocianato de fluoresceína), Molecular Probes, número de producto F-1906) almacenado en el congelador se dejó a temperatura ambiente durante una hora antes de abrirlo. Se añadió una
40 disolución de FITC (10,1 mg/ml NMP) a mezclas agitadas de moléculas anti-biotina de conejo dextrano (en total 0,750 ml, concentración de molécula equivalente a 1,5 mg anticuerpo/ml, 0,0487 mg FITC/ml, equivalente a

5 aproximadamente 8,3 FITC por anticuerpo, 0,1 M NaCl, 200 mM tampón carbonato, pH 8,5, 30°C, una hora en la oscuridad). Cualesquiera grupos reactivos remanentes se apantallaron por la adición de 1/10 de volumen de mezcla de reacción de un tampón que contiene etanolamina (110 mM etanolamina, 50 mM HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,0), y se agitó durante 30 minutos a 30°C. Las dos diferentes moléculas poliméricas anti-biotina de conejo marcadas con FITC se purificaron de fluoresceína no unida por diálisis en un float-a-lyzer (frente a 500 ml de 0,10 M NaCl, 2-4°C, en la oscuridad, 10 kDa MwCO, cambiado tres veces), 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,2).

El grado de incorporación de fluoresceína por anticuerpo, y la incorporación de anticuerpo por dextrano, se calcularon a partir de la absorbancia UV a 278 y 498 nm. A las moléculas se añadió azida sódica hasta 15 mM como un conservante.

Molécula dextrano	vehicular	Anticuerpo por dextrano (de media)	Fluoresceína anticuerpo (de media)	por	Concentración de dextrano (mol/l)
150		8,4	1,7		125,2x10 ⁻⁸
270		19,5	1,8		41,6x10 ⁻⁸

10 EJEMPLO 24

Aislamiento de CTL usando las moléculas MHC en un procedimiento de separación inmunomagnético

En este experimento, se mostró que los linfocitos T citotóxicos (CTL) reactivos a antígeno podían aislarse de una muestra de nódulo linfático de un paciente positivo para HLA-A0201 por el uso de moléculas MHC inmovilizadas en lechos magnéticos.

15 Se obtuvieron suspensiones de células únicas de material de biopsia de nódulo linfático infiltrado de melanoma después de homogeneización y centrifugación para eliminar restos celulares. El aislamiento de las células se realizó usando lechos magnéticos (Dynabeads®, con estreptavidina) recubiertos con moléculas MHC biotiniladas que presentan HLA A0201 en asociación con el análogo del péptido (SUR1/M2) (LMLGEFLKL) de survivina, un antígeno asociado a tumor identificado recientemente. Los lechos magnéticos con molécula MHC inmovilizada se añadieron a la suspensión celular y se incubó durante 30 minutos a 30°C para permitir a los lechos unirse a las células. Después de la unión, las células en roseta se aislaron usando un imán. En la Figura 45, se muestran los resultados. En la Figura 45A, se muestra la fotografía de microscopía de campo brillante de los CTL reactivos a survivina así aislados unidos a los lechos recubiertos con moléculas MHC.

25 En el mismo experimento, lechos magnéticos recubiertos con un HLA A0201/péptido influenza biotinilado recombinante se usó como control negativo. Como se muestra en la Figura 45B, los lechos magnéticos recubiertos con los complejos HLA A0201/péptido influenza no se unieron a células CTL del material de biopsia de nódulo infiltrado de melanoma.

30 Así, se espera que la alta avidéz de las construcciones de moléculas MHC de la invención resultará en una unión específica incluso mejor a las células de interés, y de acuerdo con esto dichas células pueden obtenerse usando las construcciones de moléculas MHC de la invención.

Referencias

1. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, y Davis MM, Science 274 (5284), 94-96 (octubre 1996), "Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes". Erratum in Science 280(5371), 1821 (19 June 1998).
2. Dal Porto, J, Johansen TE, Catipovic B, Parfiit DJ, Tuveson D, Gether U, Kozolowski S, Fearon DT, Schneck JP, PNAS USA 90(14), 6671-6675 (15 julio 1993), "A soluble divalent Class I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive T-cells at nanomolar concentrations".
3. Viola A, and Lanzavecchia A., APMIS 107(7), 615-623 (julio 1999), "T-cell activation and the dynamic world of rafts".
4. Zhang W, Sommers CL, Burshtyn DN, Stebbins CC, DeJarnette JB, Tribble RP, Grinberg A, Tsay HC, Jacobs HM, Kessler CM, Long EO, Love PE, y Samelson LE, Immunity 10(3), 323-332 (marzo 1999), "Essential role of LAT in T-cell development".
5. Ugolini S, y Vivier E., Curr. Opin. Immunol. 12(3), 295-300 (junio 2000), "Regulation of T-cell function by NK cell receptors for classical MHC class I molecules".
6. Ljunggren HG, Stam NJ, Ohlen C, Neefjes JJ, Hoglund P, Heemels MT, Bastin J, Schumacher TN, Townsend A, Karre K, et al., Nature 346(6283), 476-480 (2 agosto 1990), "Empty MHC class I molecules come out in the cold".
7. Coles MC, McMahon CW, Takizawa H, and Raulet DH., Eur. J. Immunol. 30(1), 236-244 (enero 2000), "Memory CD8 T

lymphocytes express inhibitory MHC-specific Ly49 receptors".

8. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, y Wiley DC., Nature 329(6139), 512-518 (8-14 octubre 1987), "The foreign antigen binding site and T-cell recognition regions of class I histocompatibility antigens".

9. Matsumura M, Fremont DH, Peterson PA, y Wilson IA, Science 257(5072), 927-934 (14 agosto 1992), "Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules".

10. US 5,635,363 (Altman).

11. Marchand M, Weynants P, Rankin E, Arienti F, Belli F, Parmiani G, Cascinelli N, Bourlond A, Vanwijck R, Humblet Y, et al., Int. J. Cancer 63(6),883-885 (11 diciembre 1995), "Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3".

12. "HLA: Genetic diversity of HLA. Functional and Medical Implication", Ed. Dominique Charron, EDK Press 1997.

13. "Molecular Cloning" (Sambrook, Fritsch y Maniatis), Cold Spring Harbor Press, 1989.

14. Merrifield RB, Stewart JM, et al., Anal. Chem. 38, 1905-1914 (1966), "Instrument for Automated Synthesis of Peptides".

15. Merrifield B., Science 232, 341-347 (1986), "Solid Phase Synthesis".

16. Barany G, Kneib-Cordonier N, et al., Int. . Peptide Protein Res. 30, 705-739 (1987), "Solid-phase peptide synthesis: A silver anniversary report".
17. Fields GB, y Noble RL, Int. J. Peptide Protein Res. 35, 161-214 (1990), "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids".
18. Gordon EM, Barrett RW, et al., J. Med. Chem. 37(10), 1385-1401 (1994), "Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 2. Combinatorial Organic Synthesis, Library Screening Strategies, and future directions".
19. Houghten RA, Pinilla C, et al., Nature 354, 84-86. (1991), "Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery".
20. Jung G, y Beck-Sickinger AG, Angew. Chem. Int. Engl. 31(4), 367-384 (1992), "Multiple Peptide Synthesis Methods and Their Applications".
21. Garboczi DN, Hung DT, y Wiley DC, PNAS USA 8(8), 3429-3433 (15 abril 1992), "HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in Escherichia coli and complexed with single antigenic peptides".
22. WO 93/01498 (A. Lihme y T. Boenisch, "Water soluble, polymer based reagents and conjugates comprising moieties derived from divinyl sulfone").
23. Larsson, Lars-Inge, "Immunocytochemistry: Theory and Practice", CRC Press inc., Boca Raton, Florida, (1988), Capitulo 3, página 77-146

24. Kuttler, C., Nussbaum, A.K., Dick, T.P., Rammensee, H.-G., Schild, H., Haderler, K.P., An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages, J. Mol. Biol. 298 (2000), 417-429

25. US 4,336,173

26. EP 0 106 873 (Sintef)

27. US 4,459,378

28. US 4,654,267

29. WO 99/11661

30. WO 91/15766

31. WO 2000/15665

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una construcción de moléculas MHC en forma soluble en un medio de solubilización o inmovilizada en un soporte sólido o semi-sólido, comprendiendo dicha construcción de moléculas MHC una molécula vehicular dextrano soluble unida al menos a 5 moléculas MHC, en el que dichas moléculas MHC están unidas a la molécula vehicular dextrano mediante más de una entidad de unión, en el que cada entidad de unión está unida a de 2 a 4 moléculas MHC.
2. Una construcción de moléculas MHC en forma soluble en un medio de solubilización o inmovilizada en un soporte sólido o semi-sólido, comprendiendo dicha construcción de moléculas MHC una molécula vehicular dextrano soluble unida al menos a 5 moléculas MHC, en el que dichas moléculas MHC están unidas directamente a la molécula vehicular dextrano y dicha construcción de moléculas MHC comprende uno o más marcadores.
- 10 3. La construcción de moléculas MHC según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la molécula MHC es una molécula MHC sin péptido o una molécula MHC rellena con péptido.
4. La construcción de moléculas MHC según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que las moléculas MHC son iguales o al menos dos de las moléculas MHC son diferentes.
- 15 5. La construcción de moléculas MHC según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que los péptidos portados por las moléculas MHC son iguales o al menos dos de los péptidos portados por las moléculas MHC son diferentes.
6. La construcción de moléculas MHC según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 5, en la que las moléculas MHC están unidas a la molécula vehicular mediante dos o más entidades de unión idénticas, o combinaciones de una o más entidades de unión diferentes.
- 20 7. La construcción de moléculas MHC según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 6, en la que la entidad de unión se selecciona de estreptavidina, y derivados de ésta, avidina y derivados de ésta, biotina, inmunoglobulinas, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos recombinantes, fragmentos de anticuerpo y derivados de éstos, dominio de cremallera de leucina de AP-1, jun, fos, hexa-his, hexa-hat glutatión S-transferasa, afinidad de glutatión, péptido de unión a calmodulina, Strep-tag, Dominio de Unión a Celulosa, Proteína de Unión a Maltosa, Etiqueta S-Péptido, Etiqueta de Unión a Quitina, Epítomos Inmunoreactivos, Etiquetas de Epítomo, Etiqueta E2, Etiqueta de Epítomo HA, Epítomo Myc, Epítomo FLAG, Epítomos AU1 y AU5, Epítomo Glu-Glu, Epítomo KT3, Epítomo IRS, Epítomo Btag, Epítomo de Proteína Quinasa C, Epítomo VSV, lecitinas que median la unión a una diversidad de compuestos, incluyendo carbohidratos, lípidos y proteínas, preferiblemente ConA o WGA y tetranectina o Proteína A y Proteína G.
- 25 8. La construcción de moléculas MHC según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además una o más moléculas biológicamente activas.
9. La construcción de moléculas MHC según la reivindicación 8, en la que las moléculas biológicamente activas están unidas a la molécula vehicular bien directamente o mediante una o más de las entidades de unión.
- 30 10. La construcción de moléculas MHC según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en la que la molécula biológicamente activa se selecciona de
- 35 (a) Proteínas del grupo de proteínas semejantes a MHC Clase I como MIC A, MIC B, CD1d, HLA E, HLA F, HLA G, HLA H, ULBP-1, ULBP-2, y ULBP-3;
- (b) moléculas co-estimuladoras del grupo de CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD9, CD27, CD28, CD30, CD69, CD134, CD137, CD147, CDw150, CD152, CD153, CD40L, NKG2D, ICOS, HVEM, HLA Clase II, PD-1, Fas, FasL expresado en células T y/o NK, CD40, CD48, CD58, CD70, CD72, B7.1, B7.2, B7RP-1, B7-H3, PD-L1, PD-L2, CD134L, CD137L, ICOSL, LIGHT expresado en APC y/o células tumorales;
- 40 (c) moléculas que modulan células del grupo de CD16, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80, 2B4, KIR, LIR, CD94/NKG2A, CD94/NKG2C expresado en células NK, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, factores estimuladores de colonias, vitamina D3, toxinas IL-2, ciclosporina, FK-506, rapamicina, TGF-beta, clotrimazol, nitrendipina, y caribdotoxina;
- 45 (d) moléculas auxiliares del grupo LFA-1, CD11a/18, CD54, CD106 y CD49a,b,c,d,e,f/CD29;
- (e) moléculas de adhesión del grupo de ICAM-1, ICAM-2, GlyCAM-1, CD34, anti-LFA-1, anti-CD44, anti-beta7, quimioquinas, CXCR4, CCR5, anti-selectina L, anti-selectina E, y anti-selectina P;
- 50 (f) moléculas tóxicas seleccionadas del grupo de ciclofosfamida, metotrexato, Azatioprina, mizoribina, 15-desoxuspergualina, neomicina, estaurosporina, genesteína, herbimicina A, exotoxina A de Pseudomonas, saporina, Rituxán, Ricina, gemtuzumab ozogamicina, toxina Shiga, metales pesados, mercuriales inorgánicos, mercuriales orgánicos, FN18-CRM9, radioisótopos, isótopos incorporados de yodo, isótopos incorporados de cobalto, isótopos incorporados de selenio, isótopos incorporados de tritio, isótopos incorporados de fósforo, haptenos, DNP, y

digoxigenina; y anticuerpos frente a cualquier molécula en (a)-(f), derivados de dichos anticuerpos y fragmentos de dichos anticuerpos, y combinaciones de éstos y

(g) proteínas, moléculas co-estimuladoras, moléculas que modulan las células, receptores, moléculas auxiliares, moléculas de adhesión, ligandos naturales, y moléculas tóxicas, y anticuerpos y moléculas de unión recombinantes de éstos, y combinaciones de éstos.

- 5 11. La construcción de moléculas MHC según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que comprende además uno o más compuestos marcadores.
12. La construcción de moléculas MHC según la reivindicación 11, en la que uno o más compuestos marcadores están unidos a la molécula vehicular y/o una o más de las entidades de unión y/o una o más moléculas MHC.
- 10 13. La construcción de moléculas MHC según la reivindicación 11 ó 12, en la que el compuesto marcador es detectable directamente o indirectamente.
14. La construcción de moléculas MHC según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que el compuesto marcador se
- 15 (a) selecciona de marcadores fluorescentes del grupo de 5- y 6-carboxifluoresceína, 5- ó 6-carboxifluoresceína, ácido 6-fluoresceín-5-y 6-carboxamido hexanoico, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, agentes de tinción, Cy2, Cy3, y Cy5, cumarina sustituida opcionalmente, AMCA, PerCP, ficobiliproteínas, R-ficoeritrina, aloficoeritrina, Rojo Texas, Rojo Princheston, proteína verde fluorescente y análogos de ésta, conjugados de R-ficoeritrina, conjugados de aloficoeritrina y Cy5 o Rojo Texas, marcadores fluorescentes inorgánicos basados en nanocristales semiconductores, quantum-dot, y marcadores fluorescentes de tiempo resuelto basados en
- 20 lantánidos, marcadores fluorescentes de tiempo resuelto basados en Eu³⁺ y marcadores fluorescentes de tiempo resuelto basados en Sm³⁺;
- (b) selecciona de haptenos del grupo de DNP, biotina, y digoxigenina;
- (c) selecciona de marcadores enzimáticos del grupo de peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, beta-N-acetil-glucosaminidasa, β-glucuronidasa, invertasa, Xantina Oxidasa, luciferasa de luciérnaga y glucosa oxidasa;
- 25 (d) selecciona de marcadores luminiscentes del grupo de luminol, isoluminol, ésteres de acridinio, 1,2-dioxoetanos y piridopiridazinas; y
- (e) selecciona de marcadores radiactivos del grupo de isótopos incorporados de yodo, isótopos incorporados de cobalto, isótopos incorporados de selenio, isótopos incorporados de tritio, e isótopos incorporados de fósforo y
- 30 (f) selecciona de un marcador fluorescente, un marcador enzimático, un radioisótopo, un marcador quimioluminiscente, un marcador bioluminiscente, un polímero, una partícula de metal, un hapteno, un anticuerpo, o un agente de tinción.
15. La construcción de moléculas MHC según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, inmovilizada directamente en el soporte sólido o semi-sólido.
- 35 16. La construcción de moléculas MHC según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, inmovilizada en el soporte sólido o semi-sólido mediante un conector, un espaciador, o un anticuerpo, un derivado de anticuerpo o un fragmento de éste.
17. La construcción de moléculas MHC según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, en la que el soporte se selecciona del grupo que consiste en partículas, lechos, partículas biodegradables, láminas, geles, filtros, membranas, membranas de nilón, fibras, capilares, agujas, tiras de microtitulación, tubos, placas o pocillos, peines, puntas de pipeta, micro matrices, chips, portaobjetos, los lechos y partículas son lechos poliméricos, partículas poliméricas, lechos magnéticos, partículas magnéticas, lechos supermagnéticos o partículas supermagnéticas.
- 40 18. La construcción de moléculas MHC según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para uso en un método de citometría de flujo, un método histológico o un método citológico.
- 45 19. Una composición que comprende una construcción de moléculas MHC según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.
20. La composición según la reivindicación 19, en la que la construcción de moléculas MHC comprende moléculas MHC llenas de péptido o moléculas MHC sin péptido; y en la que dichos péptidos para llenar las moléculas MHC sin péptido, y la construcción de moléculas MHC que comprende moléculas MHC sin péptido se proporcionan
- 50 separadamente.
21. La composición según la reivindicación 19 que comprende además una o más moléculas biológicamente activas y/o excipientes.

22. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 para uso en el tratamiento, prevención, estabilización, o alivio de una enfermedad que implica células que reconocen MHC.
23. La composición según la reivindicación 22, en la que la enfermedad tiene origen inflamatorio, auto-inmune, alérgico, viral, canceroso, infeccioso, alogénico, xenogénico, injerto frente a huésped, huésped frente a injerto, enfermedad inflamatoria crónica del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, esclerosis, diabetes tipo I, artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis atópica, asma, melanoma maligno, carcinoma renal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer del útero, cáncer prostático, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, linfoma cutáneo, carcinoma hepático, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, enfermedad relacionada con el rechazo, enfermedad de injerto frente a huésped, una enfermedad viral asociada con hepatitis, SIDA, sarampión, viruela, varicela, rubéola o herpes.
24. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23 formulada para administración parenteral, incluyendo administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, epicutánea/transdérmica, e intraperitoneal, y para infusión.
25. Uso de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24 para la fabricación de un medicamento para regular al alza, regular a la baja o modular una respuesta inmune en un animal, para inducir anergia de una célula o para inmunoterapia celular adoptiva.
26. Un método para obtener células que reconocen MHC que comprende poner en contacto una construcción de moléculas MHC según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 y una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC en condiciones mediante las cuales las células que reconocen MHC se unen a la construcción de moléculas MHC, y aislar la construcción de moléculas MHC y las células que reconocen MHC unidas.
27. El método según la reivindicación 26, en el que el aislamiento se lleva a cabo aplicando un campo magnético o por citometría de flujo.
28. Un método para producir una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, que comprende proporcionar una construcción de moléculas MHC como se define en las reivindicaciones 1 a 18, solubilizar o dispersar la construcción de moléculas MHC en un medio adecuado para sustancias terapéuticas, y opcionalmente añadir otros excipientes.
29. Un método para detectar o monitorizar la presencia de células que reconocen MHC en una muestra que comprende las etapas de
- (a) poner en contacto una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC con una construcción de moléculas MHC según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, y
- (b) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, unión que indica la presencia de células que reconocen MHC.
30. Un método para establecer un pronóstico de una enfermedad, determinando el estado de una enfermedad o diagnosticando una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de
- (a) poner en contacto una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC con una construcción de moléculas MHC según las reivindicaciones 1 a 18, y
- (b) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, estableciendo de esta manera un pronóstico de una enfermedad, determinando el estado de una enfermedad o diagnosticando una enfermedad que implica células que reconocen MHC.
31. Un método para determinar la eficacia de un medicamento frente a una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de
- (a) poner en contacto una muestra de un sujeto que recibe tratamiento con un medicamento con una construcción de moléculas de MHC según las reivindicaciones 1 a 18, y
- (b) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, determinando de esta manera la eficacia del medicamento.
32. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31, en el que las células que reconocen MHC están implicadas en una enfermedad de origen inflamatorio, auto-inmune, alérgico, viral, canceroso, infeccioso, alogénico, xenogénico, huésped frente a injerto, injerto frente a huésped o una enfermedad inflamatoria crónica del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, esclerosis, diabetes tipo I, artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis atópica, asma, melanoma maligno, carcinoma renal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer del útero, cáncer cervical, cáncer prostático, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, linfoma cutáneo, carcinoma hepático,

cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, enfermedad relacionada con el rechazo, enfermedad relacionada con injerto frente a huésped, enfermedad viral asociada con hepatitis, SIDA, sarampión, viruela, varicela, rubéola o herpes.

5 33. El método según la reivindicación 29 a 32, en el que las células que reconocen MHC se seleccionan de subpoblaciones de células T CD3+, células T gamma,delta, células T alfa,beta, células T CD4+, células T auxiliares, células T CD8+, células T supresoras, células T citotóxicas CD8+, CTL, células NK, células NKT, células LAK, y MAK.

10 34. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 33, en el que la muestra se selecciona del grupo que consiste en material histológico, material citológico, tumores primarios, metástasis orgánicas secundarias, aspirados con aguja fina, tejido del bazo, muestras de médula ósea, extensiones celulares, muestras citológicas exfoliativas, preparaciones por impronta, frotis orales, frotis laríngeos, frotis vaginales, lavado bronquial, lavado gástrico, una muestra del cordón umbilical, una muestra de fluido corporal, una muestra de sangre, una muestra de una población de células mononucleares de sangre periférica aislada de la sangre, una muestra de una preparación derivada de la sangre, una muestra de un producto de leucoféresis, muestras de esputo, expectorados, aspirados bronquiales, biopsias y secciones de biopsias.

15 35. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 34, en el que la determinación de la unión se lleva a cabo por inspección en un microscopio, por luz, por fluorescencia, por transmisión de electrones, o por citometría de flujo.

20 36. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 35, en el que la muestra se monta en un soporte, un soporte sólido o semi-sólido o en portaobjetos de vidrio, placas de microtitulación que tienen uno o más pocillos, lechos, partículas, membranas, filtros, membranas de filtro, portaobjetos poliméricos, membranas poliméricas, portaobjetos con cámara, placas, y placas petri.

37. Un método para fabricar la composición según la reivindicación 19 que comprende las etapas de

(i) proporcionar al menos 5 moléculas MHC;

(ii) proporcionar una molécula vehicular dextrano;

25 (iii) proporcionar más de una entidad de unión;

(iv) unir dichas al menos 5 moléculas MHC a dicho vehículo dextrano mediante dichas más de una entidad de unión; en el que la unión resulta en que cada entidad de unión se una a de 2 a 4 moléculas MHC;

(v) opcionalmente unir una o más moléculas biológicamente activas a dicho vehículo dextrano bien directamente o mediante dicha más de una entidad de unión;

30 (vi) opcionalmente unir uno o más compuestos marcadores a dicha molécula vehicular dextrano, o a una o más de dichas más de una entidad de unión o a una o más de dichas al menos 5 moléculas MHC;

y fabricar de esta manera la composición según la reivindicación 19.

35 38. El método según la reivindicación 26, las células que reconocen MHC se obtienen poniendo una muestra de un sujeto que comprende células que reconocen MHC en contacto con una construcción de moléculas MHC según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, mediante lo cual las células que reconocen MHC se unen a la construcción de moléculas MHC, aislando la construcción de moléculas MHC unida y las células que reconocen MHC, y opcionalmente expandiendo ex vivo dichas células que reconocen MHC hasta un número clínicamente relevante y en el que las células que reconocen MHC aisladas se liberan de la construcción de moléculas MHC antes de la expansión.

40 39. El método según cualquiera de las reivindicaciones 26 ó 38, en el que la construcción de moléculas MHC se inmoviliza en el soporte sólido o semi-sólido antes de o después del contacto con la muestra.

40. El método según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 39, en el que la expansión se lleva a cabo en presencia de una o más construcciones de moléculas MHC, opcionalmente una o más moléculas biológicamente activas y opcionalmente células alimentadoras tales como células dendríticas o células alimentadoras.

45

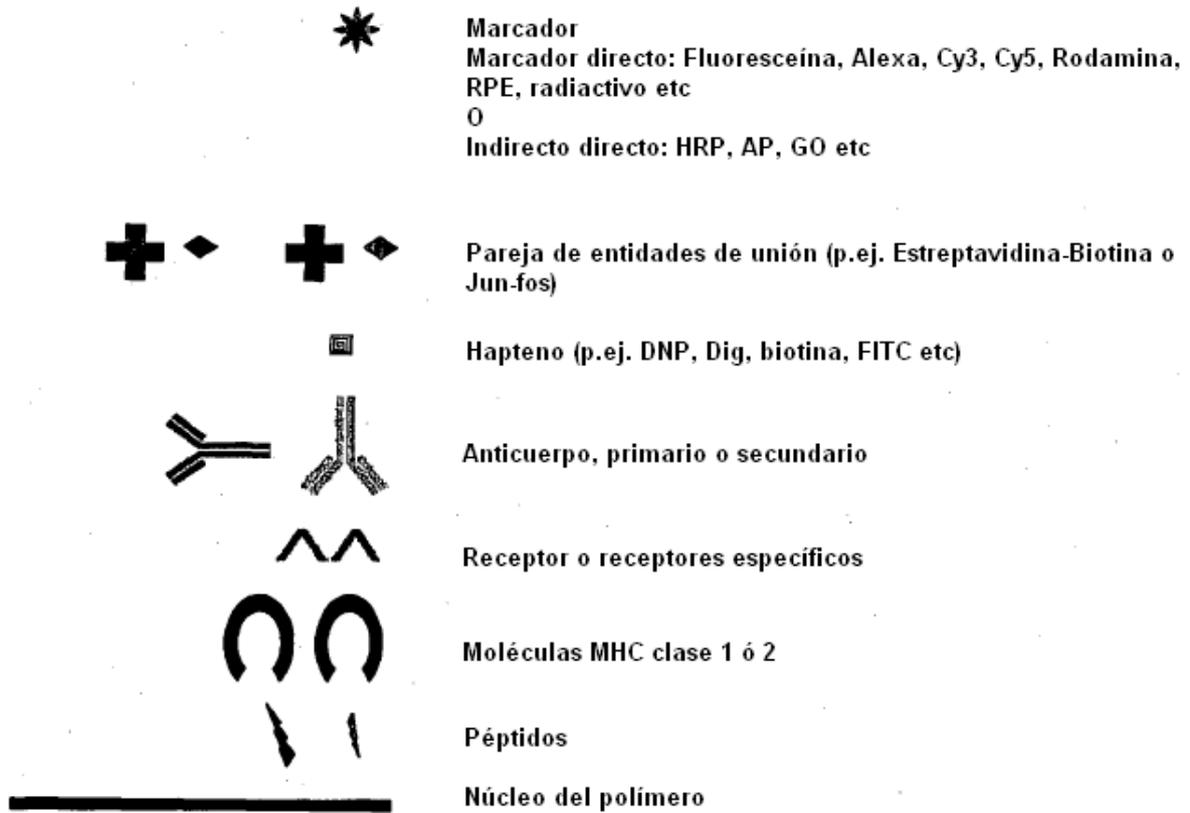


Figura 1

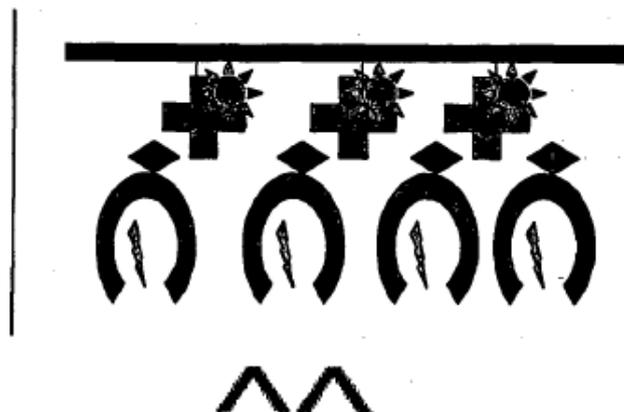


Figura 2

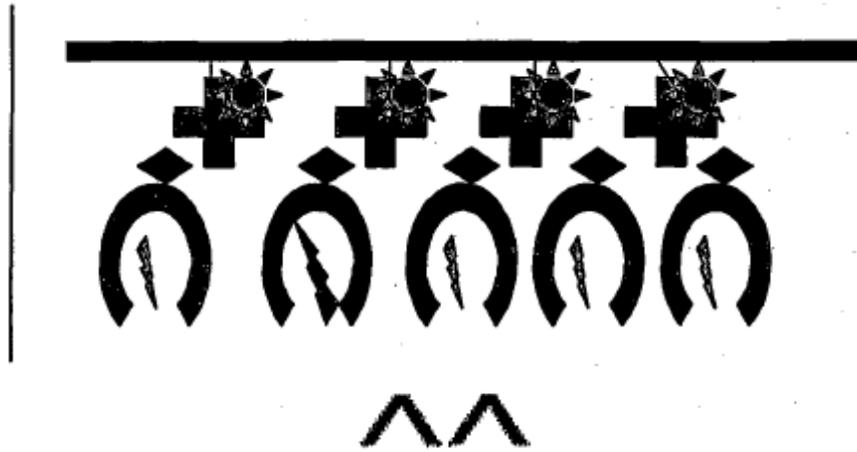


Figura 3

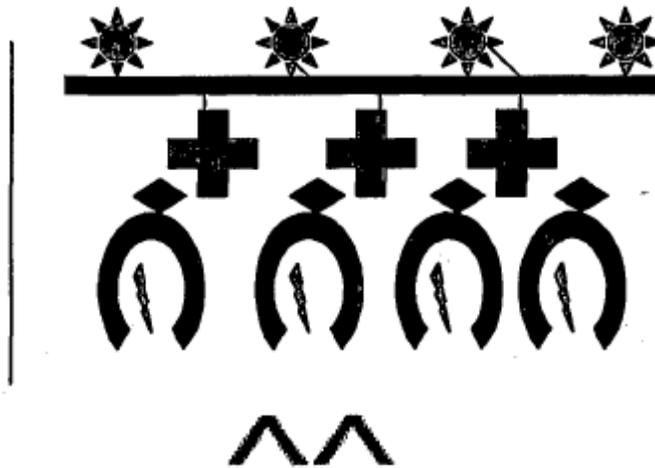


Figura 4

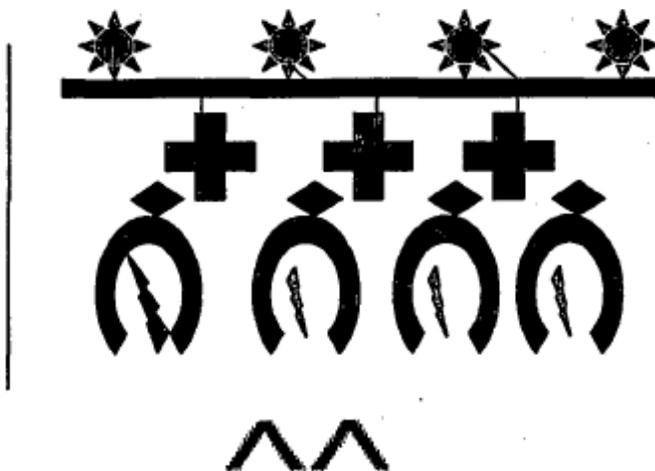


Figura 5

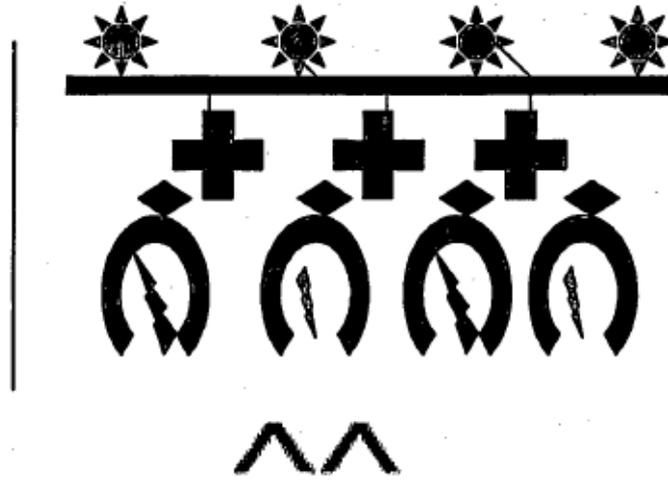


Figura 6

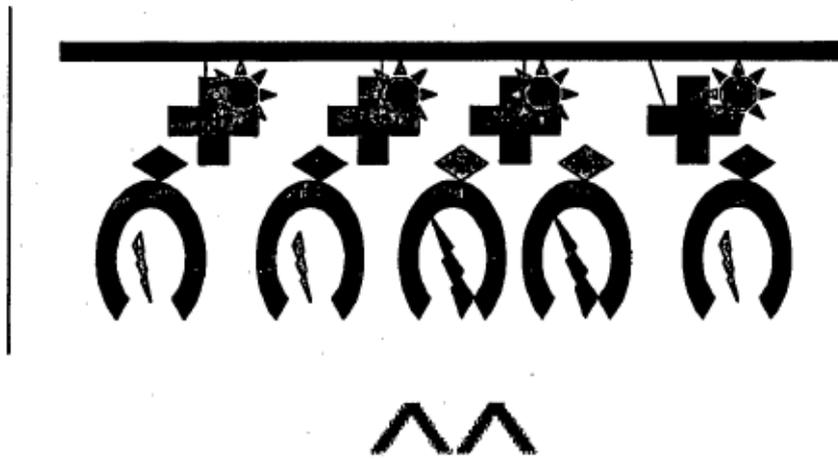


Figura 7

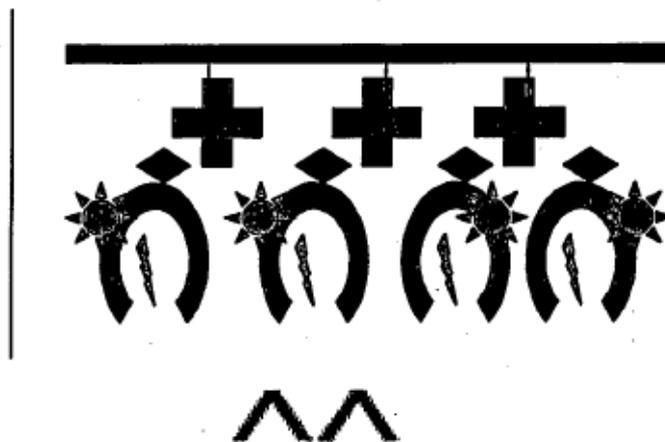


Figura 8

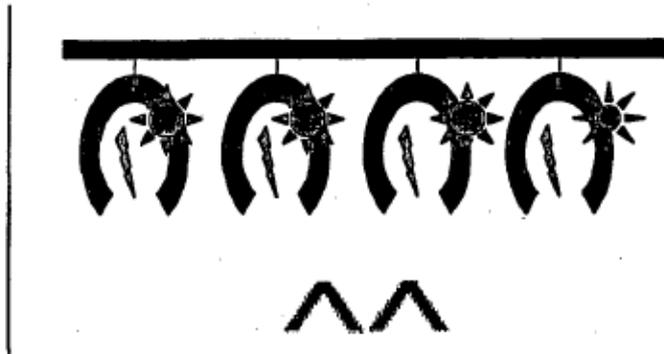


Figura 9

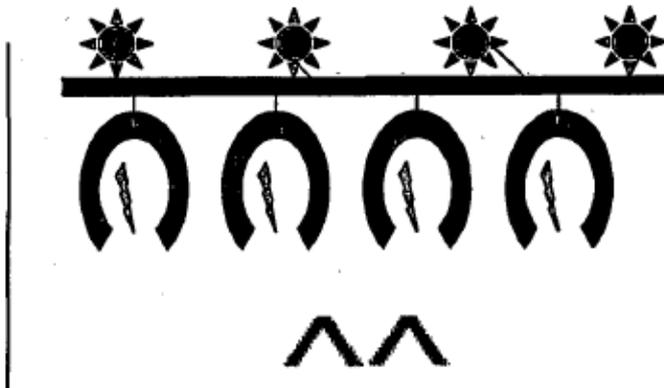


Figura 10

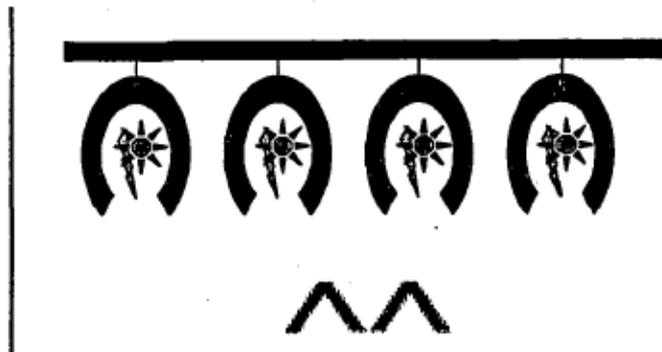


Figura 11



Figura 12

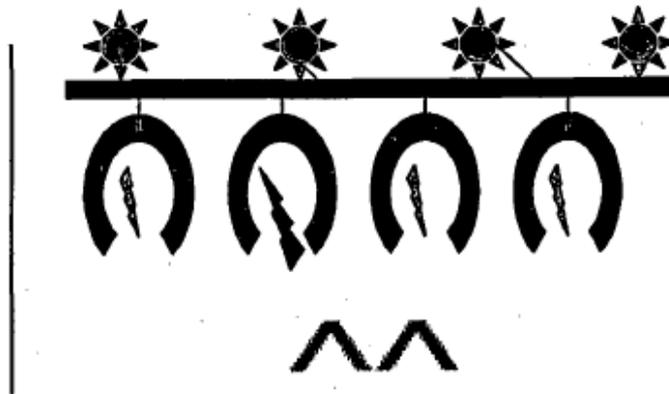


Figura 13

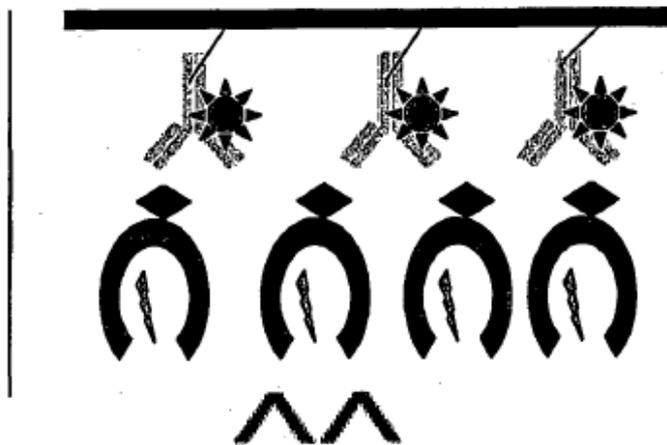


Figura 14

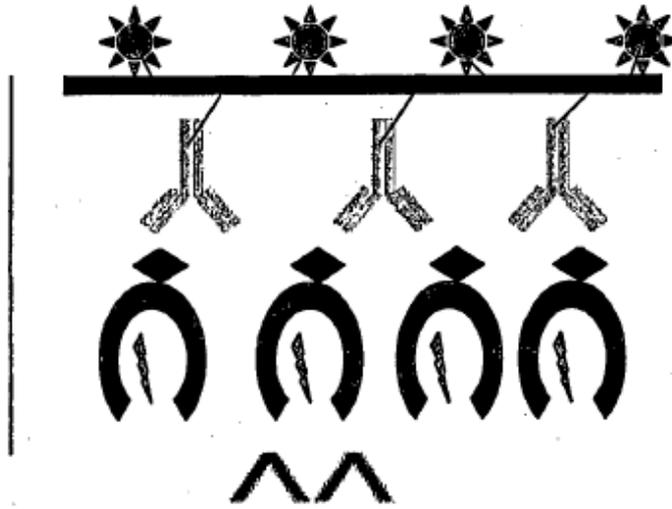


Figura 15

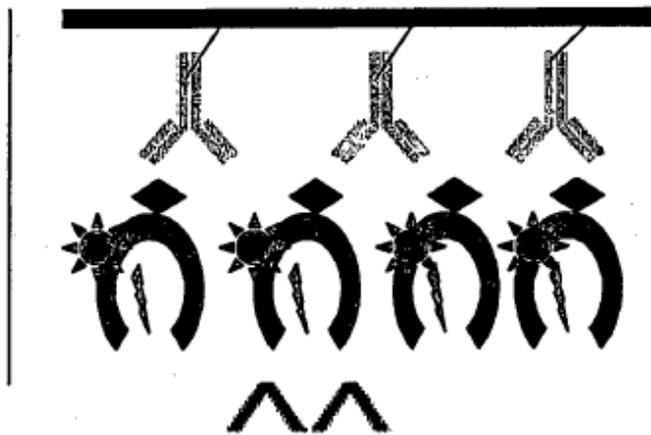


Figura 16

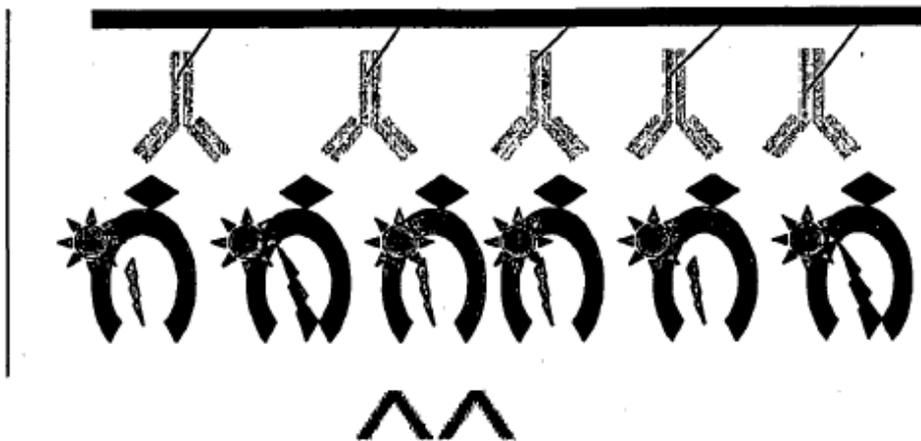


Figura 17

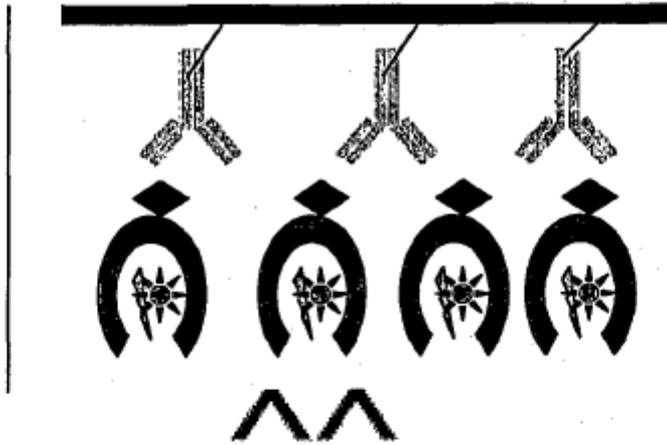


Figura 18

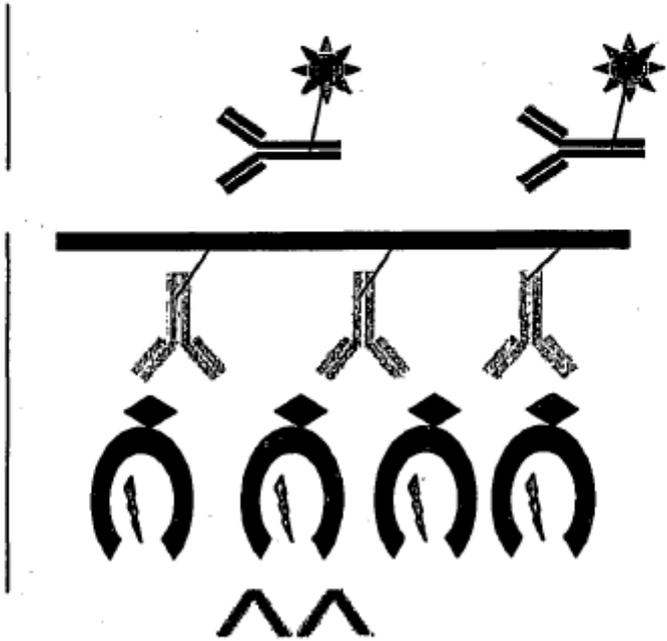


Figura 19

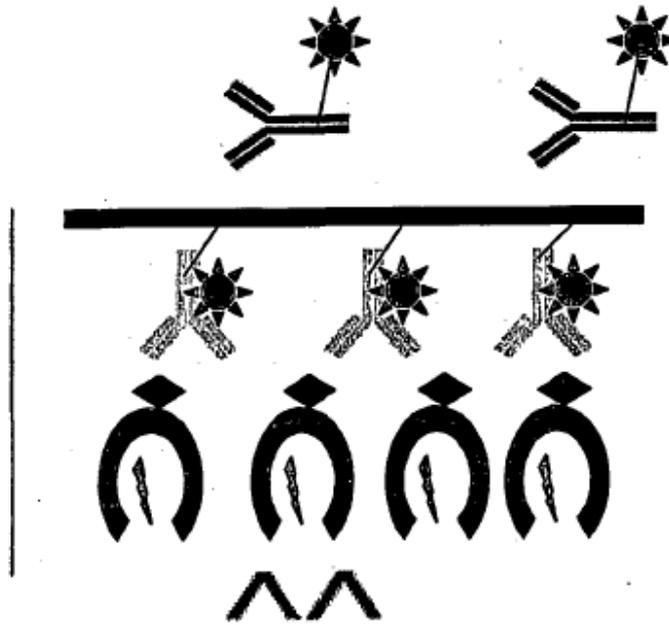


Figura 20

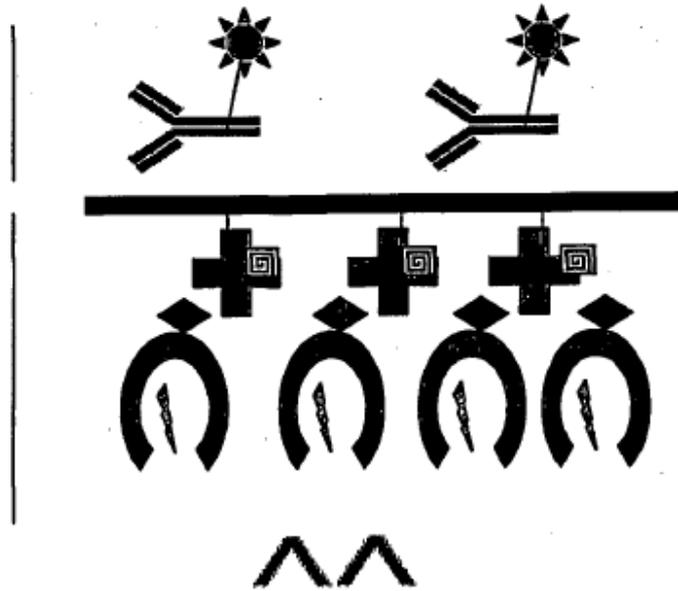


Figura 21

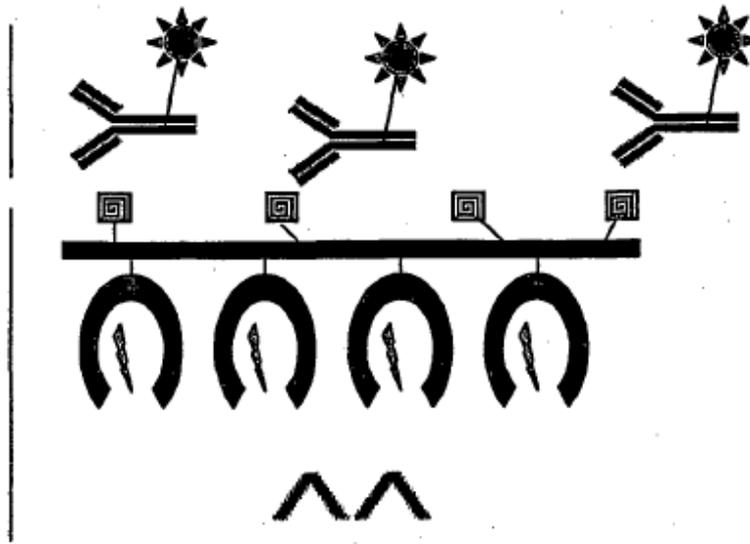


Figura 22

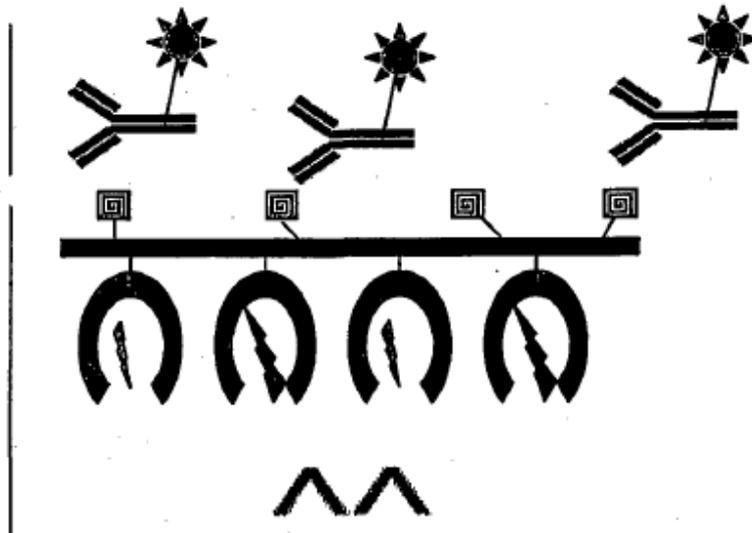


Figura 23

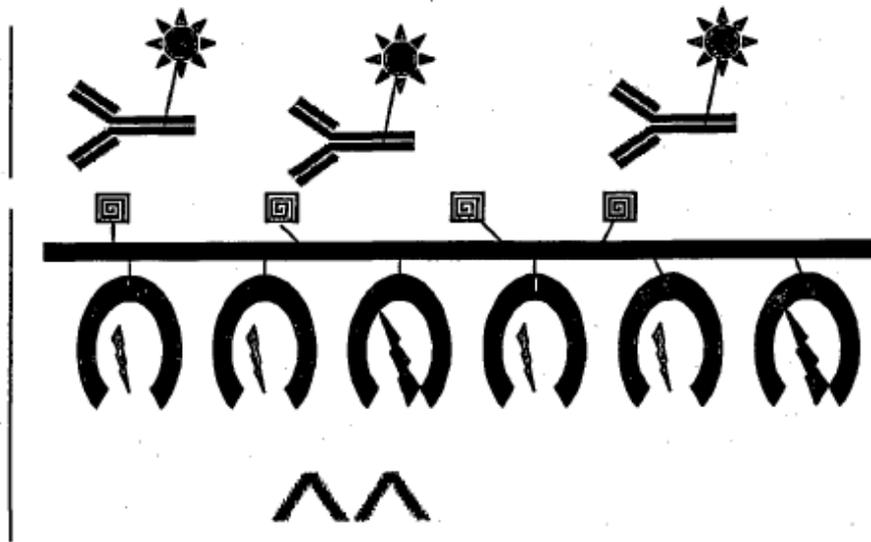


Figura 24

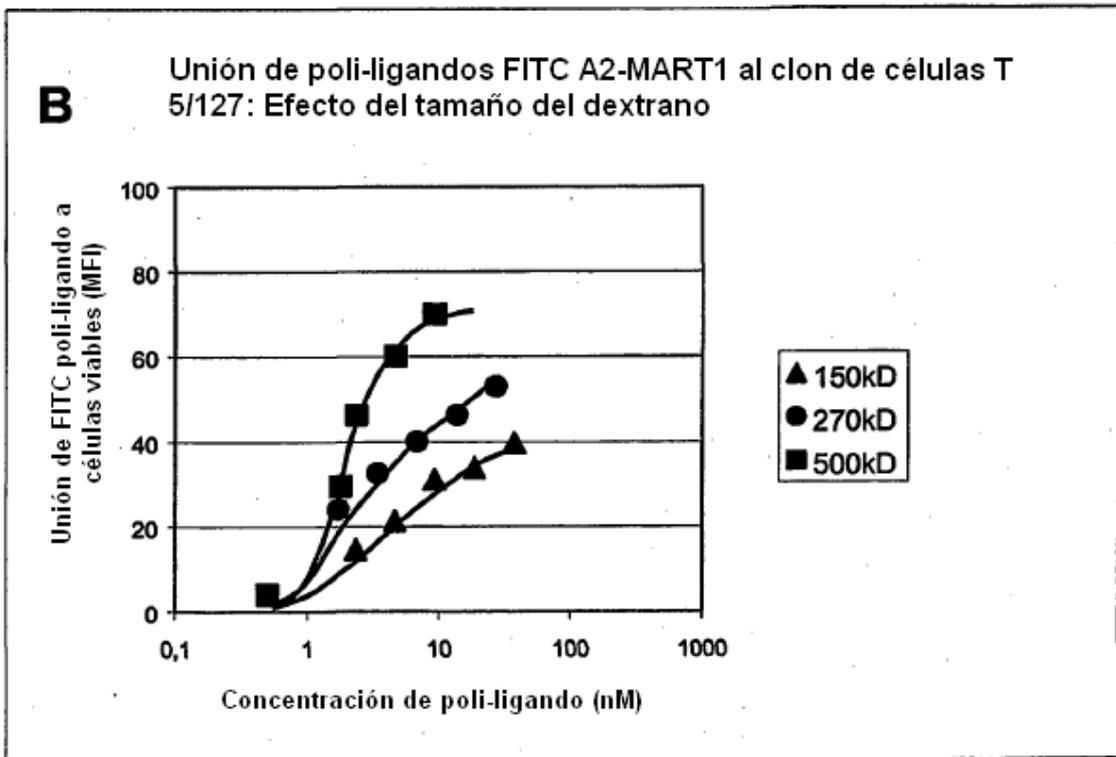
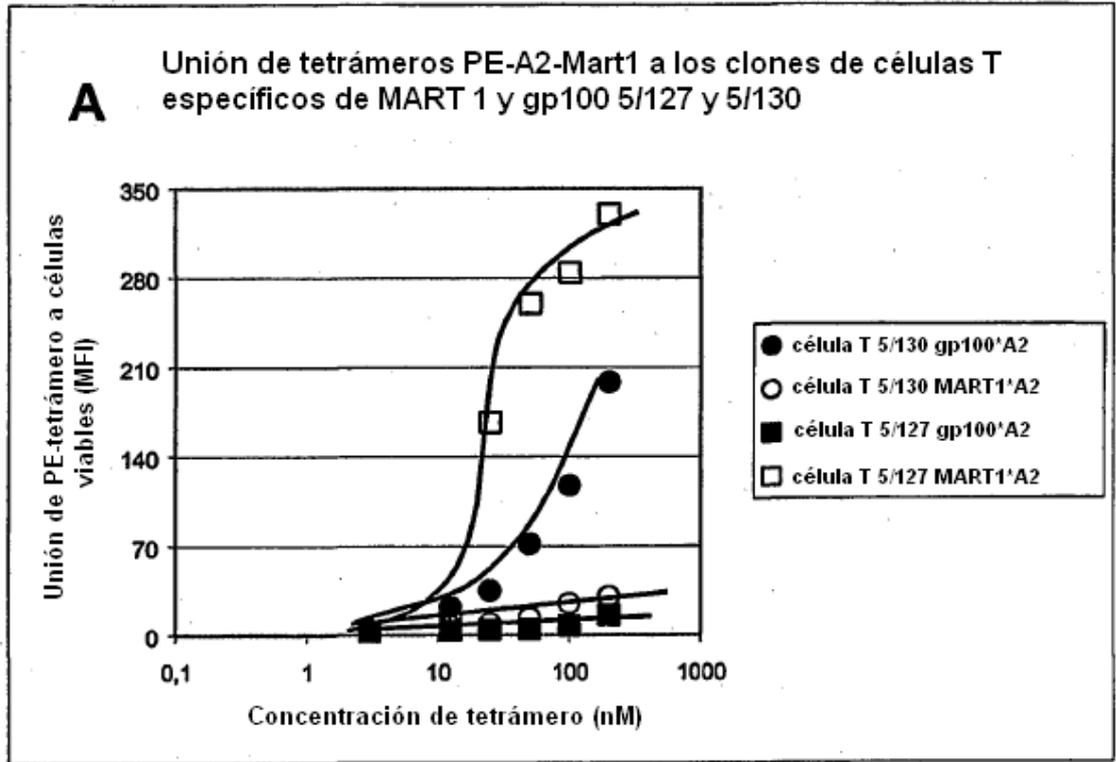


Figura 25

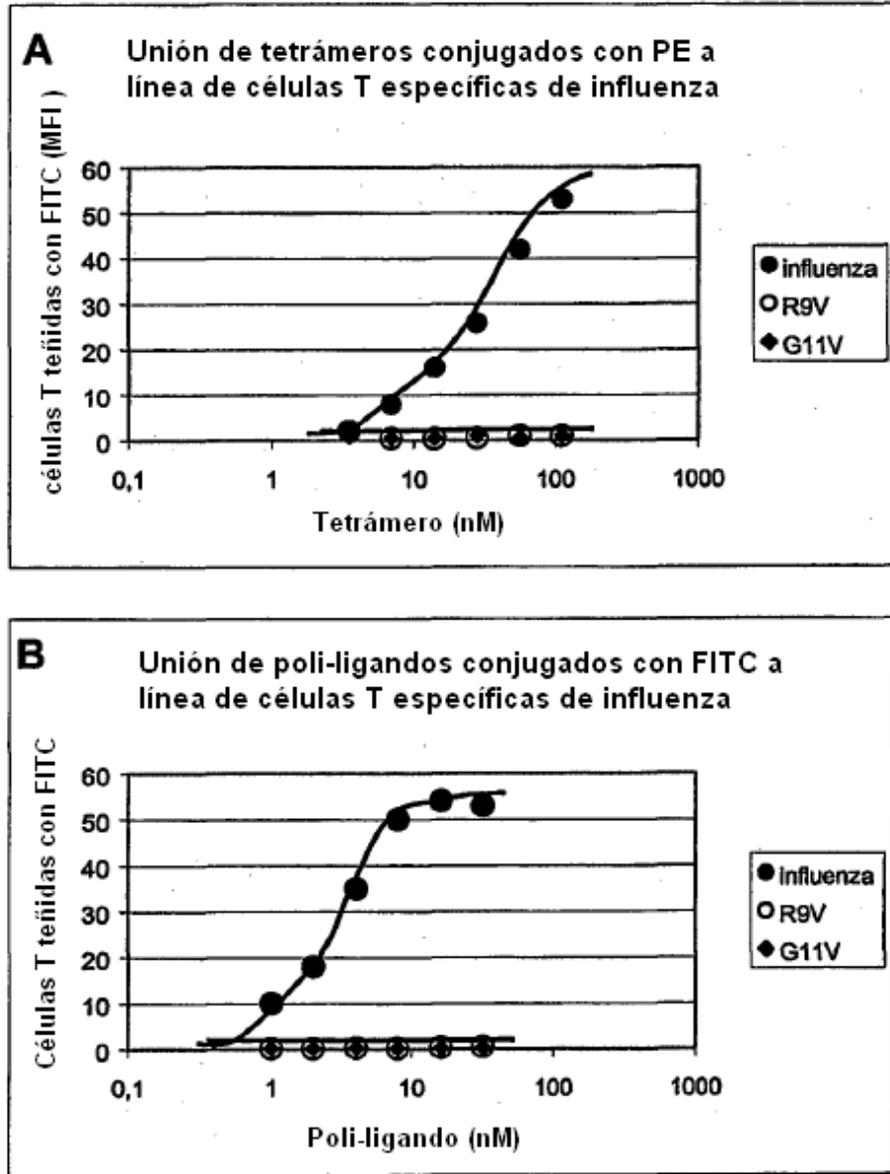


Figura 26

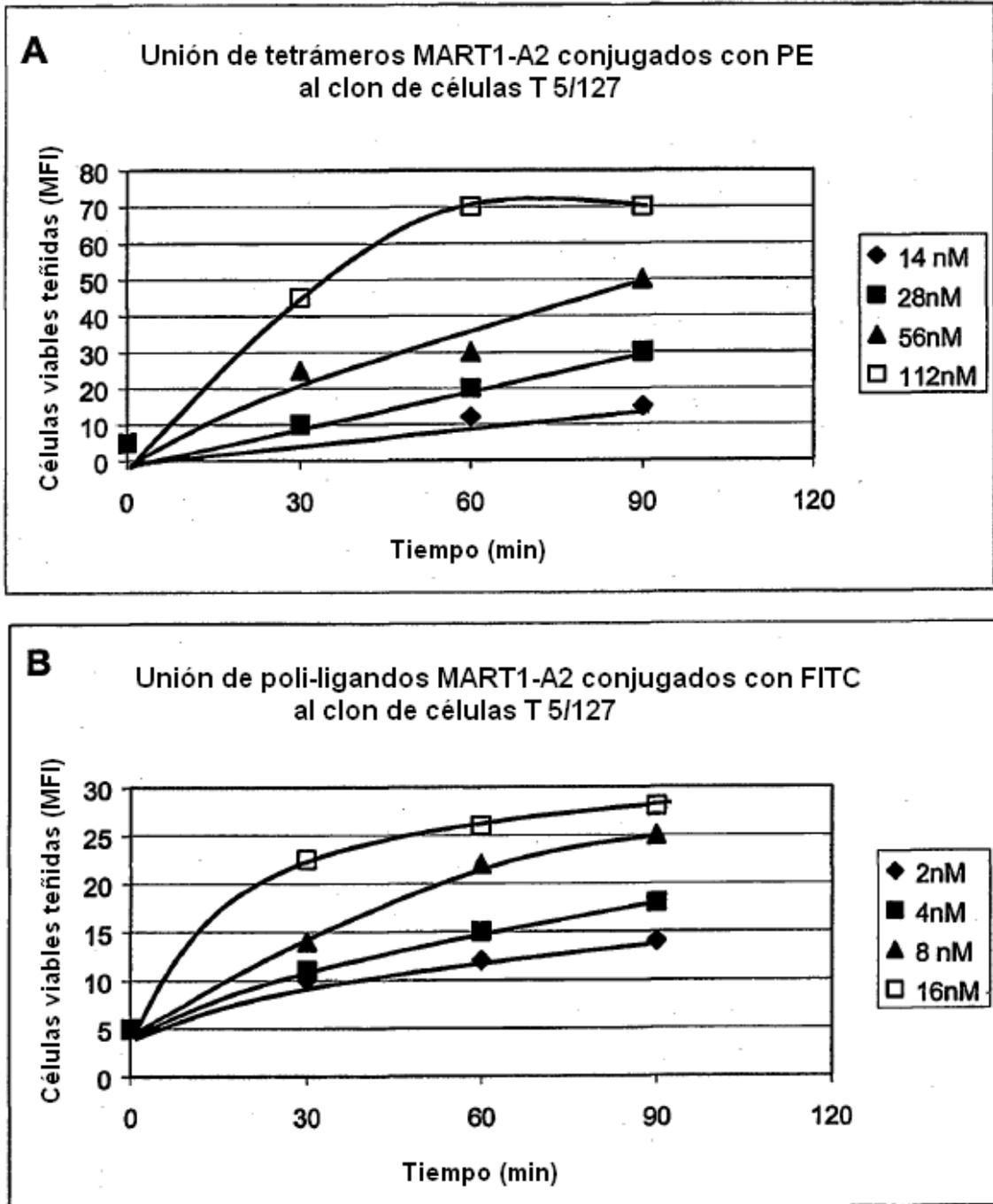


Figura 27

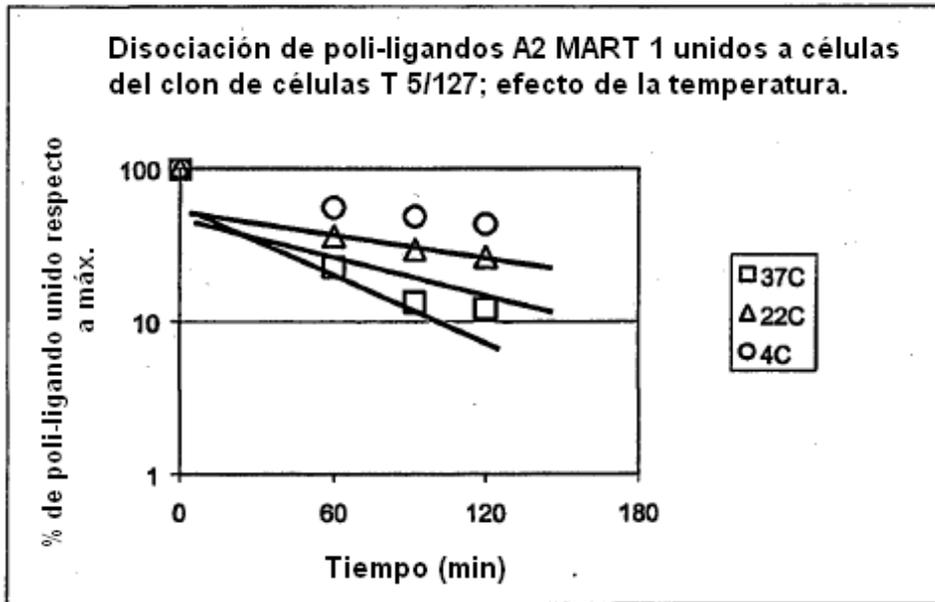


Figura 28

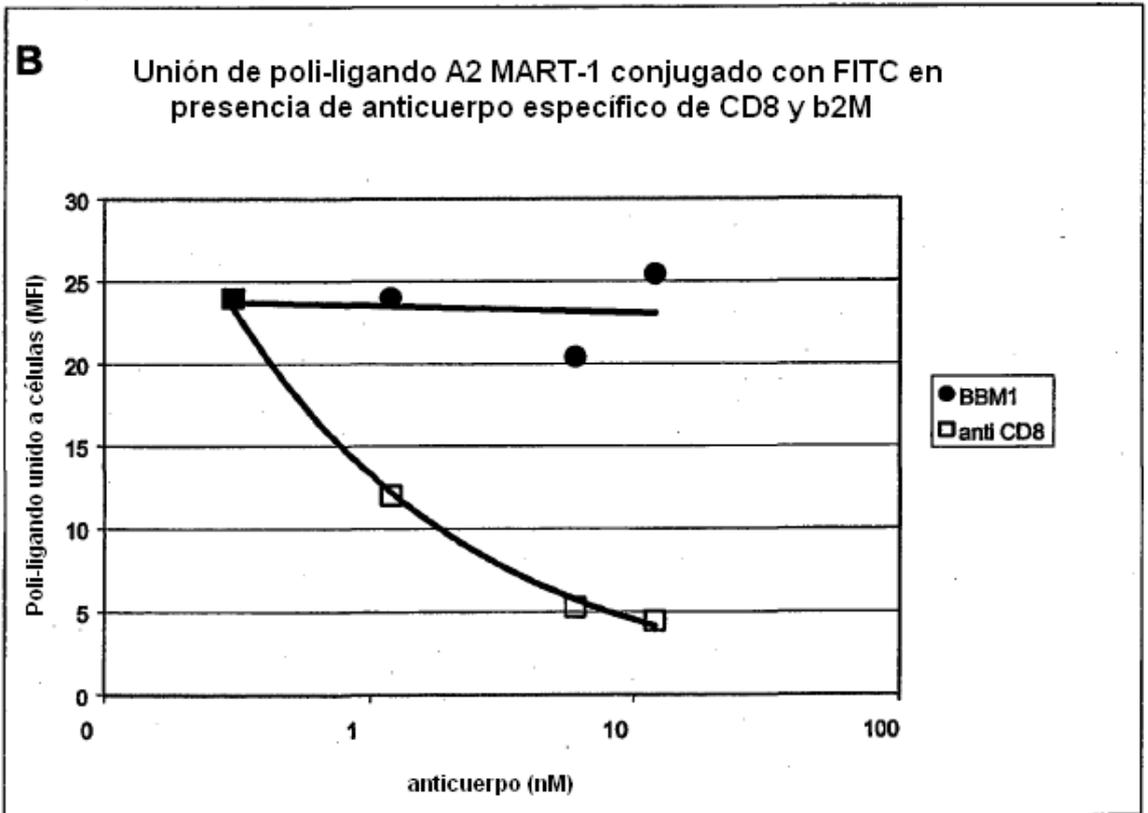
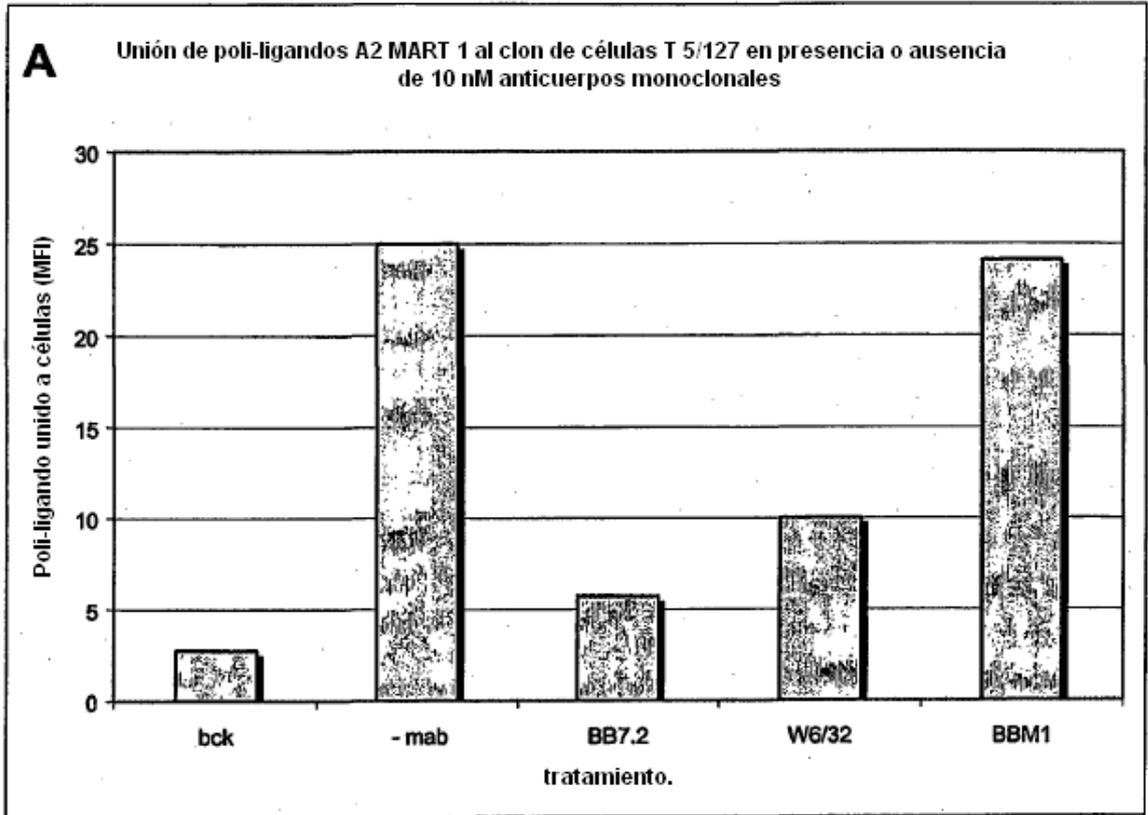


Figura 29

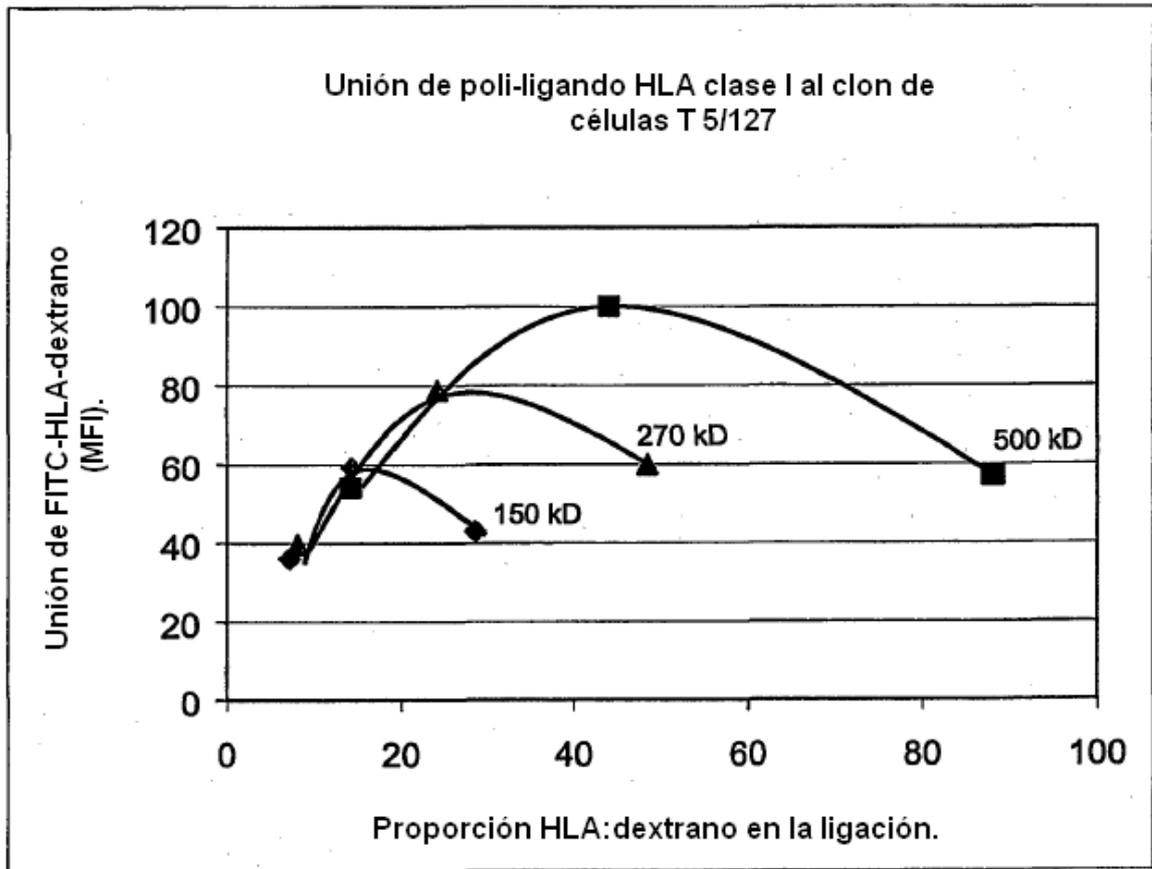
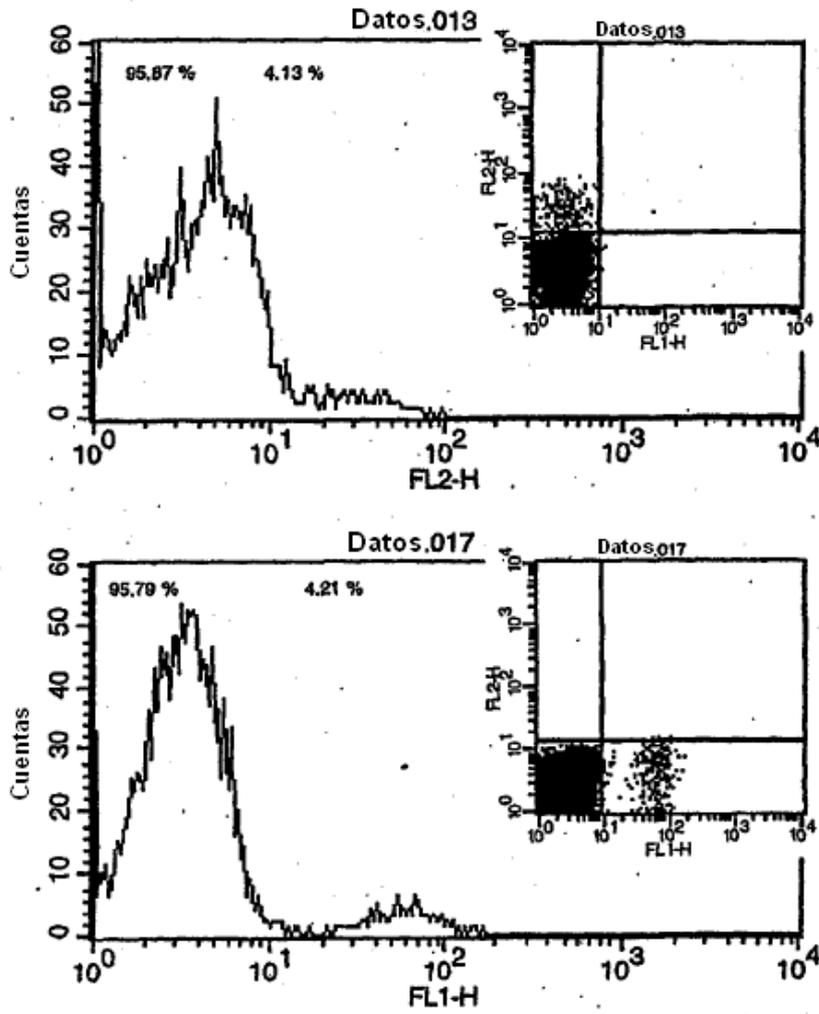


Figura 30

Análisis por citometría de flujo de subpoblación de células T específica de Mart-1



A: Tinción con proteína tetrámero Mart-1/HLA (15 nM) (conjugada con PE).

B: Tinción con proteína poli-ligando Mart-1/HLA (3 nM) (conjugada con FITC).

Figura 31

Análisis por citometría de flujo de células T específicas de Mart-1
(clon 5/127) y gp100 (clon 5/130)

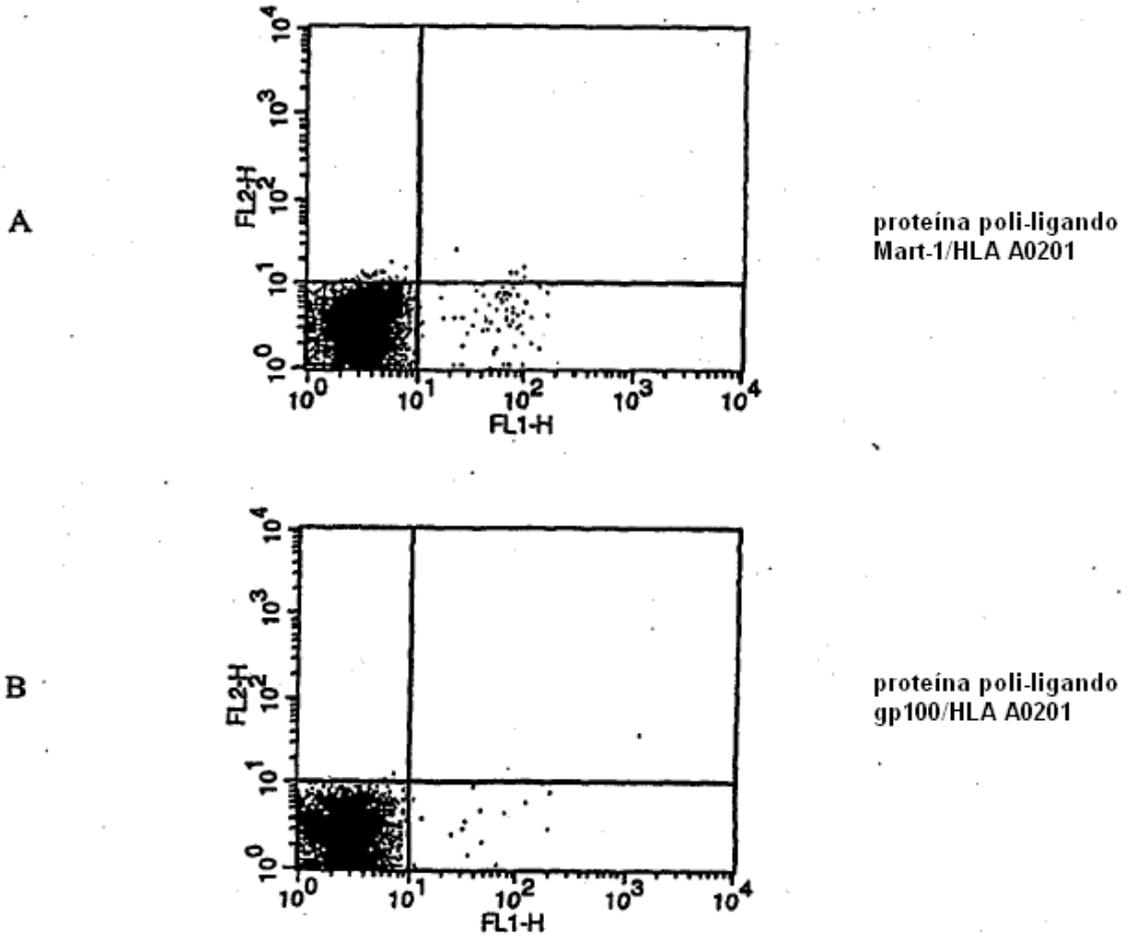


Figura 32

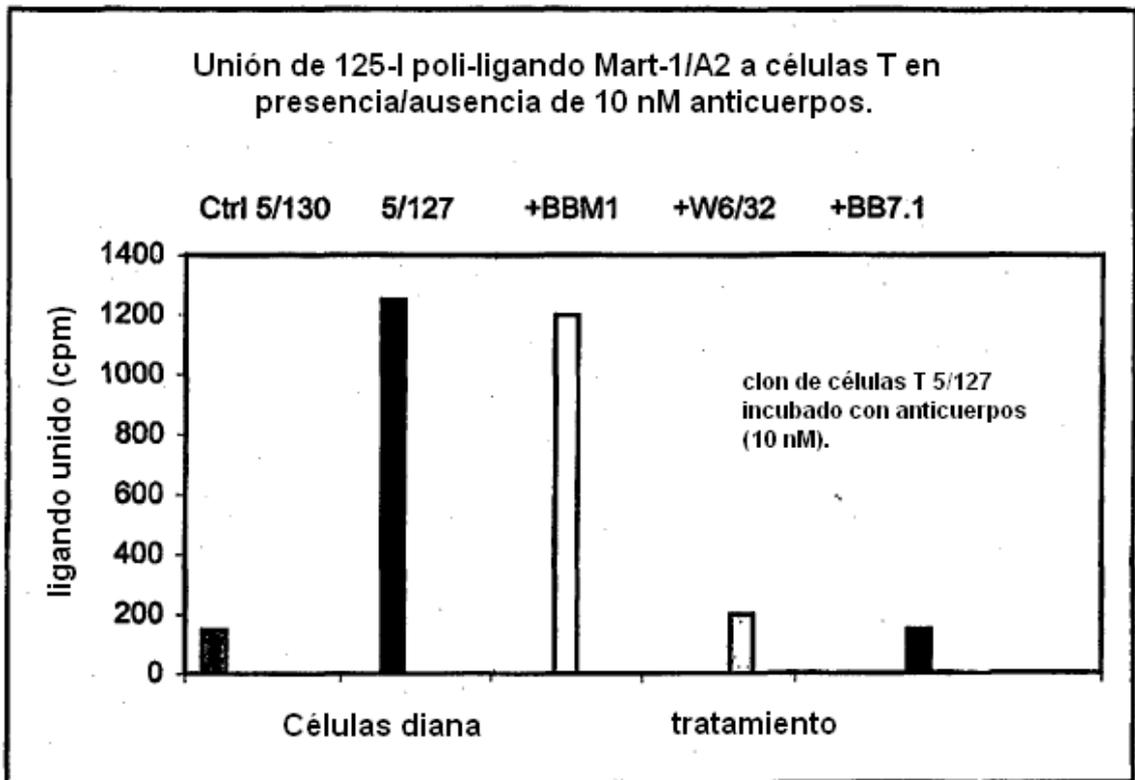


Figura 33

Figura 34

En la tabla, "X" indica aminoácidos variables.

Lista de Restos de Unión Interesantes de HLA Clase I y II				
#	Clase	Resto	Serotipo	Genotipo
1	Clase I	XX [DE] XXXXXX [Y]	A1	
2	Clase I	XX [DE] XXXXX [Y]	A1	
3	Clase I	XX [DE] XXXX [Y]	A1	
4	Clase I	XXXXXXXXX [K]	A11	A*1101
5	Clase I	XXXXXXXX [K]	A11	A*1101
6	Clase I	XXXXXXXX [K]	A11	A*1101
7	Clase I	X [LM] XXXXXXX [VL]	A2	A*0201
8	Clase I	X [LM] XXXXX [VL]	A2	A*0201
9	Clase I	X [LM] XXXXXX [VL]	A2	A*0201
10	Clase I	X [L] XXXXXX [LV]	A2	A*0202
11	Clase I	X [L] XXXXXXX [LV]	A2	A*0202
12	Clase I	X [L] XXXXX [LV]	A2	A*0202
13	Clase I	X [L] XXXXXXX [L]	A2	A*0204
14	Clase I	X [L] XXXXX [L]	A2	A*0204
15	Clase I	X [L] XXXXXX [L]	A2	A*0204
16	Clase I	X [VLIMQ] XXXXXX [L]	A2	A*0205
17	Clase I	X [VLIMQ] XXXXXXX [L]	A2	A*0205
18	Clase I	X [VLIMQ] XXXXX [L]	A2	A*0205
19	Clase I	X [V] XXXXXXX [V]	A2	A*0206
20	Clase I	X [V] XXXXX [V]	A2	A*0206
21	Clase I	X [V] XXXXXX [V]	A2	A*0206
22	Clase I	X [L] [D] XXXXXX [L]	A2	A*0207
23	Clase I	X [L] [D] XXXX [L]	A2	A*0207

24	Class I	X [L] [D] XXXXX [L]	A2	A*0207
25	Class I	X [VQL] XXXXXX [LV]	A2	A*0214
26	Class I	X [VQL] XXXXXXXX [LV]	A2	A*0214
27	Class I	X [VQL] XXXXX [LV]	A2	A*0214
28	Class I	X [Y] XXXXXXXX [ILF]	A24	
29	Class I	X [Y] XXXXXX [ILF]	A24	
30	Class I	X [Y] XXXXX [ILF]	A24	
31	Class I	X [E] XXXXXXXX [Y]	A29	A*2902
32	Class I	X [E] XXXXX [Y]	A29	A*2902
33	Class I	X [E] XXXXXXXX [Y]	A29	A*2902
34	Class I	X [LVM] XXXXXXXX [KYF]	A3	
35	Class I	X [LVM] XXXXX [KYF]	A3	
36	Class I	X [LVM] XXXXXXX [KYF]	A3	
37	Class I	XXXXXXXXX [R]	A31	A*3101
38	Class I	XXXXXXXXXX [R]	A31	A*3101
39	Class I	XXXXXXXX [R]	A31	A*3101
40	Class I	XXXXXXXXXX [R]	A33	A*3302
41	Class I	XXXXXXXXXX [R]	A33	A*3302
42	Class I	XXXXXXXX [R]	A33	A*3302
43	Class I	X [VT] XXXXX [RK]	A68	A*6801
44	Class I	X [VT] XXXXXXXX [RK]	A68	A*6801
45	Class I	X [VT] XXXXXXX [RK]	A68	A*6801
46	Class I	X [VTA] XXXXXXX [VL]	A69	A*6901
47	Class I	X [VTA] XXXXXXXX [VL]	A69	A*6901
48	Class I	X [VTA] XXXXX [VL]	A69	A*6901
49	Class I	X [RK] XX [RH] XXX [L]	B14	
50	Class I	X [RK] XX [RH] XX [L]	B14	
51	Class I	X [RK] XX [RH] XXXX [L]	B14	
52	Class I	X [R] XXXXXXXX	B27	

53	Class I	X[R] XXXXXX	B27	
54	Class I	X[R] XXXXXX	B27	
55	Class I	X[R] XXXXXX [FYILW]	B27	B*2702
56	Class I	X[R] XXXXX [FYILW]	B27	B*2702
57	Class I	X[R] XXXXXXX [FYILW]	B27	B*2702
58	Class I	X[R] XXXXXXX [LF]	B27	B*2705
59	Class I	X[R] XXXXXX [LF]	B27	B*2705
60	Class I	X[R] XXXXX [LF]	B27	B*2705
61	Class I	X[P] XXXXXXX [YFMLI]	B35	B*35
62	Class I	X[P] XXXXXX [YFMLI]	B35	B*35
63	Class I	X[P] XXXXX [YFMLI]	B35	B*35
64	Class I	X[P] XXXXXXX [YFMLI]	B35	B*3501
65	Class I	X[P] XXXXX [YFMLI]	B35	B*3501
66	Class I	X[P] XXXXXXX [YFMLI]	B35	B*3501
67	Class I	X[P] XXXXX [M]	B35	B*3503
68	Class I	X[P] XXXXXXX [M]	B35	B*3503
69	Class I	X[P] XXXXXX [M]	B35	B*3503
70	Class I	X[DE] XXXXX [FML] [IL]	B37	B*3701
71	Class I	X[DE] XXXXXX [FML] [IL]	B37	B*3701
72	Class I	X[DE] XXXX [FML] [IL]	B37	B*3701
73	Class I	XXXXXXXXXX [FL]	B38	B*3801
74	Class I	XXXXXXXXXX [FL]	B38	B*3801
75	Class I	XXXXXXXX [FL]	B38	B*3801
76	Class I	X[RH] XXXXXXX [L]	B39	B*39011
77	Class I	X[RH] XXXXXX [L]	B39	B*39011
78	Class I	X[RH] XXXXX [L]	B39	B*39011
79	Class I	X[KQ] XXXXXX [L]	B39	B*3902
80	Class I	X[KQ] XXXXXXX [L]	B39	B*3902
81	Class I	X[KQ] XXXXX [L]	B39	B*3902

82	Class I	X [E] XXXXXXXX [L]	B40	
83	Class I	X [E] XXXXXX [L]	B40	
84	Class I	X [E] XXXXXXX [L]	B40	
85	Class I	X [E] XXXXXXXX [Y]	B44	
86	Class I	X [E] XXXXXX [Y]	B44	
87	Class I	X [E] XXXXXXX [Y]	B44	
88	Class I	X [E] XXXXXX [FY]	B44	B*4402
89	Class I	X [E] XXXXXXXX [FY]	B44	B*4402
90	Class I	X [E] XXXXXXX [FY]	B44	B*4402
91	Class I	X [E] XXXXXX [YF]	B44	B*4403
92	Class I	X [E] XXXXXXXX [YF]	B44	B*4403
93	Class I	X [E] XXXXXXX [YF]	B44	B*4403
94	Class I	X [M] XXXXXXXX [YF]	B46	B*4601
95	Class I	X [M] XXXXXXX [YF]	B46	B*4601
96	Class I	X [M] XXXXXX [YF]	B46	B*4601
97	Class I	X [APG] XXXXXX [FI]	B51	B*5101
98	Class I	X [APG] XXXXXXX [FI]	B51	B*5101
99	Class I	X [APG] XXXXXXXX [FI]	B51	B*5101
100	Class I	X [PAG] XXXXXX [IV]	B51	B*5102
101	Class I	X [PAG] XXXXXXXX [IV]	B51	B*5102
102	Class I	X [PAG] XXXXXX [IV]	B51	B*5102
103	Class I	X [APG] XXXXXX [VIF]	B51	B*5103
104	Class I	X [APG] XXXXXX [VIF]	B51	B*5103
105	Class I	X [APG] XXXXXXXX [VIF]	B51	B*5103
106	Class I	XXXXXXX [IV] [IV]	B52	B*5201
107	Class I	XXXXXXX [IV] [IV]	B52	B*5201
108	Class I	XXXXXXXXX [IV] [IV]	B52	B*5201
109	Class I	X [P] XXXXXX [LIVMY]	B53	B*5301
110	Class I	X [P] XXXXXX [LIVMY]	B53	B*5301

111	Class I	X[P]XXXXXXXX [LIVMY]	B53	B*5301
112	Class I	X[P]XXXXXXXX	B54	B*5401
113	Class I	X[P]XXXXXXXX	B54	B*5401
114	Class I	X[P]XXXXXX	B54	B*5401
115	Class I	X[P]XXXXXXXX	B55	B*5501
116	Class I	X[P]XXXXXXXX	B55	B*5501
117	Class I	X[P]XXXXXX	B55	B*5501
118	Class I	X[P]XXXXXXXX	B55	B*5502
119	Class I	X[P]XXXXXX	B55	B*5502
120	Class I	X[P]XXXXXXXX	B55	B*5502
121	Class I	X[P]XXXXXXXX [A]	B56	B*5601
122	Class I	X[P]XXXXXX [A]	B56	B*5601
123	Class I	X[P]XXXXX [A]	B56	B*5601
124	Class I	X[AST]XXXXXXXX [FW]	B58	B*5801
125	Class I	X[AST]XXXXX [FW]	B58	B*5801
126	Class I	X[AST]XXXXXX [FW]	B58	B*5801
127	Class I	X[E]XXXXXXXX [L]	B60	B*40012
128	Class I	X[E]XXXXXXXX [L]	B60	B*40012
129	Class I	X[E]XXXXX [L]	B60	B*40012
130	Class I	X[E]XXXXXXXX [V]	B61	B*4006
131	Class I	X[E]XXXXXXXX [V]	B61	B*4006
132	Class I	X[E]XXXXX [V]	B61	B*4006
133	Class I	X[QL]XXXXXX [FY]	B62	B*1501
134	Class I	X[QL]XXXXX [FY]	B62	B*1501
135	Class I	X[QL]XXXXXXXX [FY]	B62	B*1501
136	Class I	X[P]XXXXXXXX [L]	B67	B*6701
137	Class I	X[P]XXXXXX [L]	B67	B*6701
138	Class I	X[P]XXXXX [L]	B67	B*6701
139	Class I	X[P]XXXXXX [LF]	B7	

140	Class I	X [P] XXXXX [LF]	B7	
141	Class I	X [P] XXXXXXX [LF]	B7	
142	Class I	X [P] XXXXXX [L]	B7	B*0702
143	Class I	X [P] XXXXX [L]	B7	B*0702
144	Class I	X [P] XXXXXXX [L]	B7	B*0702
145	Class I	X [P] XXXXXXX [L]	B7	B*0703
146	Class I	X [P] XXXXX [L]	B7	B*0703
147	Class I	X [P] XXXXXX [L]	B7	B*0703
148	Class I	X [P] XXXXXXX [L]	B7	B*0705
149	Class I	X [P] XXXXXX [L]	B7	B*0705
150	Class I	X [P] XXXXX [L]	B7	B*0705
151	Class I	X [R] XXXXX [P]	B73	B*7301
152	Class I	X [R] XXXXXX [P]	B73	B*7301
153	Class I	X [R] XXXXXXX [P]	B73	B*7301
154	Class I	X [PAG] XXXXXXX	B78	B*7801
155	Class I	X [PAG] XXXXXX	B78	B*7801
156	Class I	X [PAG] XXXXXXX	B78	B*7801
157	Class I	XX [K] X [KR] XX [L]	B8	
158	Class I	XX [K] X [KR] XXXX [L]	B8	
159	Class I	XX [K] X [KR] XXX [L]	B8	
160	Class I	X [YPF] XXXXXXX [LF]	C4	Cw*0401
161	Class I	X [YPF] XXXXXX [LF]	C4	Cw*0401
162	Class I	X [YPF] XXXXX [LF]	C4	Cw*0401
163	Class I	X [AL] XXXXXX [L]	Cw1	Cw*0102
164	Class I	X [AL] XXXXXXX [L]	Cw1	Cw*0102
165	Class I	X [AL] XXXXX [L]	Cw1	Cw*0102
166	Class I	X [A] XXXXXXX [LM]	Cw10	Cw*0304
167	Class I	X [A] XXXXX [LM]	Cw10	Cw*0304
168	Class I	X [A] XXXXXX [LM]	Cw10	Cw*0304

169	Class I	XXXXXXXXXX [LFMI]	Cw3	Cw*0301
170	Class I	XXXXXXXX [LFMI]	Cw3	Cw*0301
171	Class I	XXXXXXXXXX [LFMI]	Cw3	Cw*0301
172	Class I	XXXXXXXX [LIVF]	Cw6	Cw*0601
173	Class I	XXXXXXXXXX [LIVF]	Cw6	Cw*0601
174	Class I	XXXXXXXX [LIVF]	Cw6	Cw*0601
175	Class I	XXXXXXXXXX [LIVF]	Cw6	Cw*0602
176	Class I	XXXXXXXX [LIVF]	Cw6	Cw*0602
177	Class I	XXXXXXXXXX [LIVF]	Cw6	Cw*0602
178	Class I	XXXXXXXX [YFL]	Cw7	Cw*0702
179	Class I	XXXXXXXXXX [YFL]	Cw7	Cw*0702
180	Class I	XXXXXXXX [YFL]	Cw7	Cw*0702
181	Class II	[MV] XXX [MY] XX [MV] X	DPA1*0102	DPA1*0102
182	Class II	[WY] XXXXXXXX	DPA1*0102	DPA1*0102
183	Class II	[FL] XXX [FL] XX [IA] X	DPA1*0102	DPA1*0102
184	Class II	XXXXXXXXXX [L]	DPA1*0201	DPA1*0201
185	Class II	[A] XXXXX [A] XXX	DPA1*0201	DPA1*0201
186	Class II	[WY] XXXXXXXX	DPB1*0201	DPB1*0201
187	Class II	[MV] XXX [MY] XX [MV] X	DPB1*0201	DPB1*0201
188	Class II	[FL] XXX [FL] XX [IA] X	DPB1*0201	DPB1*0201
189	Class II	[A] XXXXX [A] XXX	DPw4	DPB1*0401
190	Class II	XXXXXXXXXX [L]	DPw4	DPB1*0401
191	Class II	XXX [I] XXXXX	DQ2	DQB1*0201
192	Class II	XXXXXXXXXX [M]	DQ2	DQB1*0201
193	Class II	XXXXX [E] XXX	DQ2	DQB1*0201
194	Class II	XXXX [Y] XXXX	DQ7	DQB1*0301
195	Class II	XXXXXXXXXX [M]	DQA1*0501	DQA1*0501
196	Class II	XXX [I] XXXXX	DQA1*0501	DQA1*0501
197	Class II	XXXX [Y] XXXX	DQA1*0501	DQA1*0501

198	Class II	XXXXX [B] XXX	DQA1*0501	DQA1*0501
199	Class II	XXXXX [P] XXX	DR1	DRB1*0101
200	Class II	XXX [Q] XXXX [Y]	DR1	DRB1*0101
201	Class II	XXXXX [P] XXX	DR1	DRB1*0102
202	Class II	XXX [M] XXXXX	DR1	DRB1*0102
203	Class II	[F] XXXX [H] XXX	DR11	DRB1*1101
204	Class II	[V] XXXXXXXX	DR11	DRB1*1104
205	Class II	[L] XX [M] XXXXX	DR11	DRB1*1104
206	Class II	[I] XXXX [R] XXX	DR11	DRB1*1104
207	Class II	[V] X [A] XXXXX [V]	DR12	DRB1*1201
208	Class II	[IL] XX [L] X [R] XX [Y]	DR13	DRB1*1301
209	Class II	[V] XX [V] X [K] XX [F]	DR13	DRB1*1301
210	Class II	XXX [M] XXXX [A]	DR13	DRB1*1301
211	Class II	XXX [A] XXXX [S]	DR13	DRB1*1301
212	Class II	XXX [W] XXXX [T]	DR13	DRB1*1301
213	Class II	XXX [Y] XXXXX	DR13	DRB1*1301
214	Class II	XXXXX [R] XXX	DR13	DRB1*1302
215	Class II	[I] XX [W] XXXXX	DR13	DRB1*1302
216	Class II	[A] XX [A] XXXX [T]	DR13	DRB1*1302
217	Class II	[V] XX [M] X [K] XXX	DR13	DRB1*1302
218	Class II	XXX [Y] XXXXX	DR13	DRB1*1302
219	Class II	[I] XX [I] XX [V] XX	DR15	DRB1*1501
220	Class II	[L] XX [F] XX [I] XX	DR15	DRB1*1501
221	Class II	XXXXXX [F] XX	DR15	DRB1*1501
222	Class II	[V] XX [Y] XX [L] XX	DR15	DRB1*1501
223	Class II	XXXXXX [M] XX	DR15	DRB1*1501
224	Class II	XXXXXXXX [F]	DR17	DRB1*0301
225	Class II	[V] XXXX [N] XXX	DR17	DRB1*0301
226	Class II	XXX [D] XXXXX	DR17	DRB1*0301

227	Class II	[M] XXXXXXXX	DR4	DRB1*0401
228	Class II	XXXXXXXX [K]	DR4	DRB1*0401
229	Class II	XXX [M] XXXXX	DR4	DRB1*0402
230	Class II	XXXXX [K] XX [H]	DR4	DRB1*0402
231	Class II	XXX [W] XXXXX	DR4	DRB1*0402
232	Class II	XXXXX [R] XX [K]	DR4	DRB1*0404
233	Class II	[M] XXXXXXXX	DR4	DRB1*0405
234	Class II	[W] XX [VK] X [DS] XX [N]	DR4	DRB1*0407
235	Class II	[FY] XX [A] X [NT] XX [Q]	DR4	DRB1*0407
236	Class II	XXX [N] XXXXX	DR52	DRB3*0202
237	Class II	XXXXXXXX [V]	DR52	DRB3*0301
238	Class II	[IL] XX [N] X [AS] XX [IL]	DR52	DRB3*0301
239	Class II	XXX [S] XXXXX	DR9	DRB1*0901

Figura 35

Proteínas VIH/SIV (fuente <http://hiv-web.lanl.gov/immunology/-index.html>)

Nombre	Tamaño	Función
Gag MA	p17	anclaje a membrana, interacción env
CA	p24	núcleo de cápside virión
NC	p7	nucleocápside, une ARN virión Vpr virión
Proteasa (RP)	p15	gag/pol escisión y maduración virión
Transcriptasa inversa (RT)	p66	p51 transcripción inversa virión
Env	gp120/gp41	glicoproteínas virales externas se unen a CD4 y quimioquina co-receptores membrana plasmática
Tat	p16/p14	transactivador transcripcional viral
Rev	p19	transporte, estabilidad y fact utilización ARN
Nef	p27-p25	regulación a la baja CD4 y MHC Clase I
Vpx	p12-16	homólogo Vpr? Presente en VIH-2
Tev	p28	Proteína tripartita tat-env-rec

Figura 36

Antígenos asociados a tumor reconocidos por linfocitos T (fuente: Sociedad de Cáncer Danesa)

Proteínas sobre-expresadas en tumores

p53, WT1, HER-2/neu, alfa fetoproteína, MUC-1, MUC-2, telomerasa, survivina, FBP

Proteínas virales

Proteínas HPV (E6 y E7), EBV (LPM2)

Proteínas mutadas, únicas o expresadas aberrantemente

CDK-4, P21 ras, MUM-1, MUM-2, MUM-3 (helicasa), beta-catenina, NA17-A/Gnt-V, p15, pg100-in4, caspasa-8, hsp70-2, factor de elongación 2, HLA-A2 mutada, miosina clase I, carboxil esterasa intestinal, proteína de fusión BCR-ABL, idiotipo

Antígenos de diferenciación específicos de linaje

Próstata: PSA, PSMA, PAP

Melanoma: tirosinasa, gp100, MART-1, TRP-1, TRP-2, MC1R

Antígenos cáncer/testículos

Familia MAGE-A: MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12

Familia MAGE-B: MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B6

Familia GAGE: GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7B, GAGE-8

Familia LAGE: LAGE-1a, LAGE-1b, NY-ESO-1

Miembros separados: BAGE, PRAME (MAPE), SART-1, SART-3, ART-4

Figura 37

Epitopos VIH CTL mejor definidos (fuente <http://hiv-web.lanl.gov/immunology/index.html>)

HLA	Proteína	AA	Aislado	Secuencia
HLA-A2				
	p17	77-85	LAI	SLYNTVATL
	Johnson91			
	Parker92			
	Parker94			
	RT	33-41	LAI	ALVEICTEM
	RT	346-354	LAI	VIYQYMDDL
	Walker89			
	Tsomides91			
A*0201				
	gp120	311-320	III-B	RGPGRAFVTI
	gp41	818-827	LAI	SLLNATDIAV
	nef	136-145	LAI	PLTFGWCYKL
	nef	180-189	LAI	VLEWRFDSRL
HLA-A3.1				
	p17	18-26	LAI	KIRLRPGGK
	p17	20-28	LAI	RLRPGGKKK
	p17	20-29	LAI	RLRPGGKKKY
	RT	33-43	LAI	ALVEICTEMEK
	RT	325-333	LAI	AIFQSSMTK
	gp120	37-46	LAI	TVYYGVPVWK
	gp41	775-785	LAI	RLRDLILLIVTR
	nef	73-82	LAI	QVPLRPMTYK
HLA-A11				
	p17	84-92	LAI	TLYVCHQRI
	p24	349-359	III-B	ACQGVGGPGGHK
	RT	325-333	LAI	AIFQSSMTK
	RT	508-517	LAI	PLRPMTYK

	nef	75-82	LAI	PLRPMTYK
	nef	84-82	LAI	AVDLSHFLK
HLA-A19				
A*7401	RT	71-79	Clade A/B/D	ITLWQRPLV
HLA-A24				
	p17	28-36	LAI	KYKCLKHIVW
	p24	296-306	HIL-1 Clade A	RDYVDRFFKTL
	gp120	53-62	LAI	LFCASDAKAY
	gp41	591-598	LAI	YKDKQQLL
	nef	138-147	LAI	RYPLTFGW
HLA-A25				
	p24	145-155	LAI	QAISPRTLNAW
	p24	203-212	LAI	ETINEEAAEW
HLA-A26				
	p24	167-175	LAI	EVIPMFSAL
	RT	593-603	LAI	ETFYVDGAANR
HLA-A28				
A*6802	RT	71-79	Clade A/B/D	ITLWQRPLV
A*6802	RT	85-93	Clade D	DTVLEEMNL
HLA-A29				
	gp120	376-384	LAI	FNCGGEFFY
HLA-A31				
	gp41	775-785	LAI	RLRDLLLVTR
HLA-A32				
	RT	559-568	LAI	PIQKETWETW
	gp120	419-427	HXB2	RIKQIINMW
HLA-B7				
	p24	148-156	LAI	SPRTLNAWV
	p24	179-187	LAI	ATPQDLNTM
	RT	323-332	LAI	SPAIFQSSMT

gp120	303-312	LAI	RPNNNTRKSI
gp41	843-851	LAI	IPRRIRQGL
nef	68-77	LAI	FPVTPQVPLR
nef	77-85	LAI	RPMTYKAAL
nef	128-137	LAI	TPGPGVRYPL

HLA-B8

p17	24-31	LAI	GGKKKYKL
p17	74-82	lai	ELRSLYNTV
p24	260-267	LAI	EIYKRWII
gp120	2-10	III-B	RVKEYQHL
gp41	591-598	LAI	YLKDQQLL
Johnson92			
Shankar96			
nef	13-20	LAI	WPTVRERM
nef	90-97	LAI	FLKEKGGL
Culmann-			
Peciolelli94			
Price97			

HLA-B14

p24	298-306	LAI	DRFYKTLRA
gp41	589-597	LAI	ERYLKDQQL

HLA-B15

gp120	375-383	LAI	SFNCGGEFF
-------	---------	-----	-----------

HLA-B18

p24	293-302	HIV-1 Clade B/D	FRDYVDRFYK
nef	135-143	LAI	YPLTFGWCY

HLA-B27

p17	18-27	LAI	KIRLRPGGKK
p17	19-27	LAI	IRLRPGGKK
p24	263-272	LAI	KRWIILGLNK
Nixon88, Buseyne93			
gp41	590-597	LAI	RYLKDQQL

	gp41	791-799	LAI	GRRGWEALKY
HLA-B*2703				
	p24	265-274	HIV-2	RRWIQLGLQK
B*2705	nef	105-114	LAI	RRQDILDLWI
	nef	73-82	LAI	QVPLRPMTYK
	nef	134-141	LAI	RYPLTFGW
HLA-B35				
	p17	124-132	JH31	NSSKVSQNY
	p17	36-44	LAI	WASRELERF
	p24	254-262	U455	PPIPVGDIY
	RT	262-270	LAI	TVLDVGDAY
	RT	273-282	III-B	VPLDEDFRKY
	Sipsas97, Shiga96			
	RT	328-336	III-B	HPDIVIYQY
	gp120	42-52	LAI	VPVWKEATTTL
	gp41	611-619	LAI	TAVPWNASW
	nef	74-81	LAI	VPLRPMTY
	Culmann91, Culmann- Penciolelli94			
	gag	245-253	HIV-2	NPVPVGNIIY
HLA-B37				
	nef	120-128	LAI	YFPDWQNYT
HLA-B29				
	p24	193-201	LAI	GHQAAMQML
HLA-B42				
	p17	20-29	LAI	RLRPGGKKY
	RT	438-446	LAI	YPGIKVRQL
HLA-B44				
	p17	306-316	SF2	AEQASQDVKNW
	gp120	30-38	SF33	AENLWVTVY
HLA-B*4402				

	p24	294-304	HIV-1 Clade B	RDYVDRFYKTL
HLA-B45				
	RT	591-600	LAI	GAETFYVDGA
HLA-B51				
	p24	325-333	LAI	NANPDCKTI
	RT	42-50	LAI	EKEGKISKI
	RT	295-302	III-B	TAFTIPSI
	gp41	557-565	III-B	RAIEAQQHL
HLA-B52				
	p24	275-282	LAI	RMYSPTSI
HLA-B53				
	HIV-2 gag	173-181	HIV-2	TPYDINQML
HLA-B55				
	gp120	42-51	LAI	VPVWKEATTT
HLA-B57				
	p24	147-1555	III-B	ISPRTLNAW
	Johnson91, Goulder96			
	p24	140-149	LAI	TSTLQEQIGW
	p24	162-172	LAI	KAFSPEVIPMF
	p24	240-249	LAI	TSTLQEQIGW
	p24	311-319	LAI	QASQEVKNW
	p24	311-319	LAI	QASQDVKNW
	nef	116-125	LAI	HTQGYFPDWO
	nef	120-128	LAI	YFPDWQNYT
HLA-B58				
	p24	240-249	LAI	TSTLQEQIGW
HLA-B60				
	p17	240-249	LAI	TSTLQEQIGW
HLA-Bw62				
	p17	20-29	LAI	RLRPGGKKKY
	p24	268-277	LAI	LGLNKIVRMV

RT	415-426	III-B	LVGKLNWASQIY
RT	476-485	LAI	ILKEPVHGVY
nef	84-91	LAI	AVDLSHFL
Culmann- Peniolelli94			
nef	117-127	LAI	TQGYFPDWQNY
HLA-Cw*01,02			
p24	168-175	LAI	VIPMFSAL
HLA-Cw4			
gp120	380-388	LAI	SFNCGGEFF

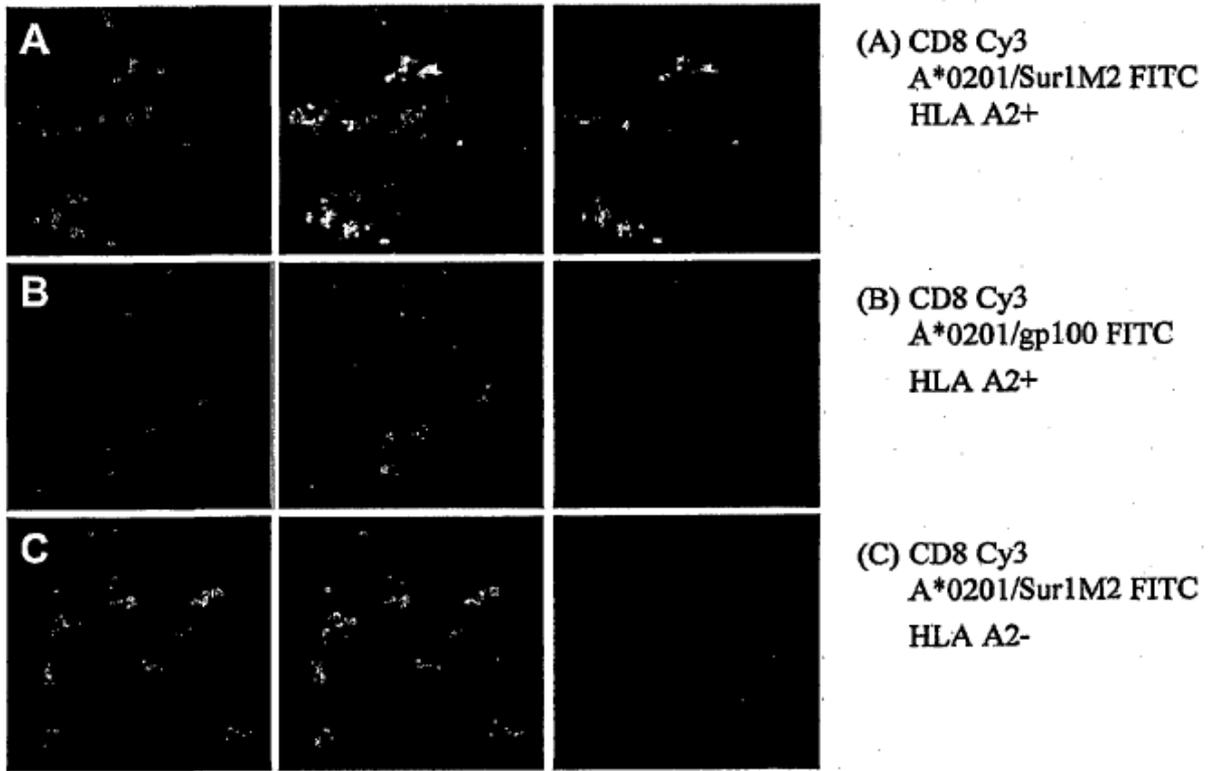


Figura 38

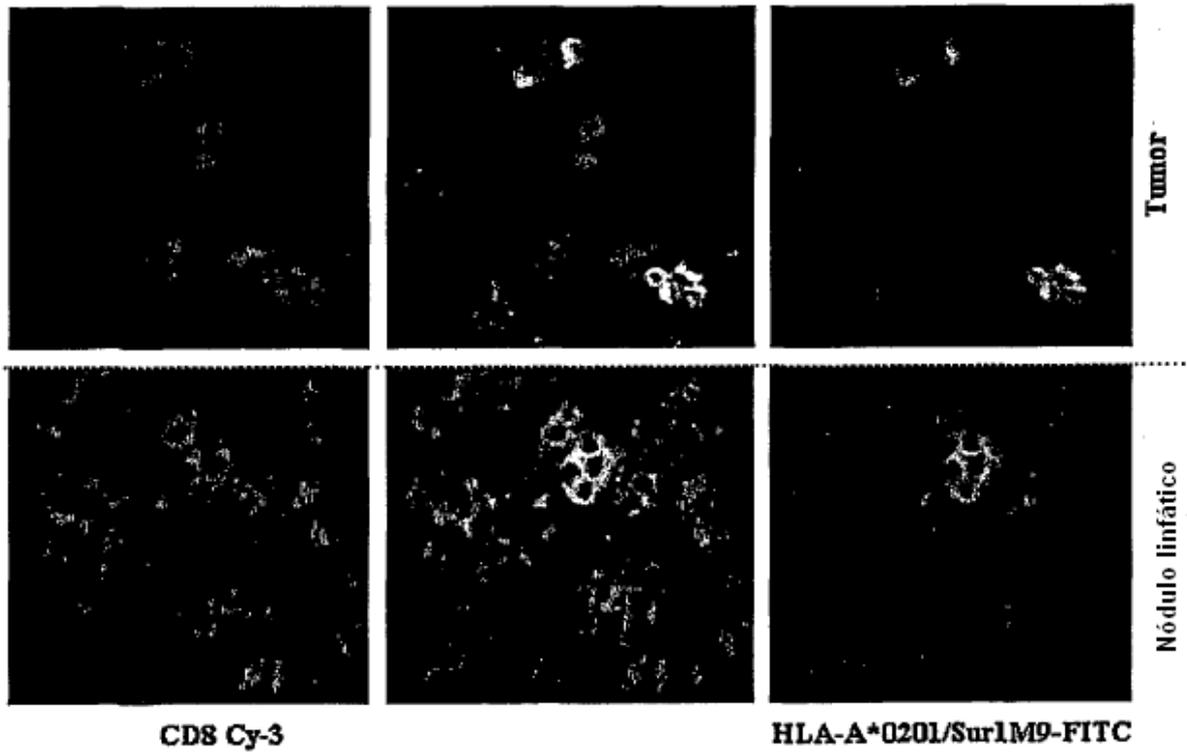


Figura 39

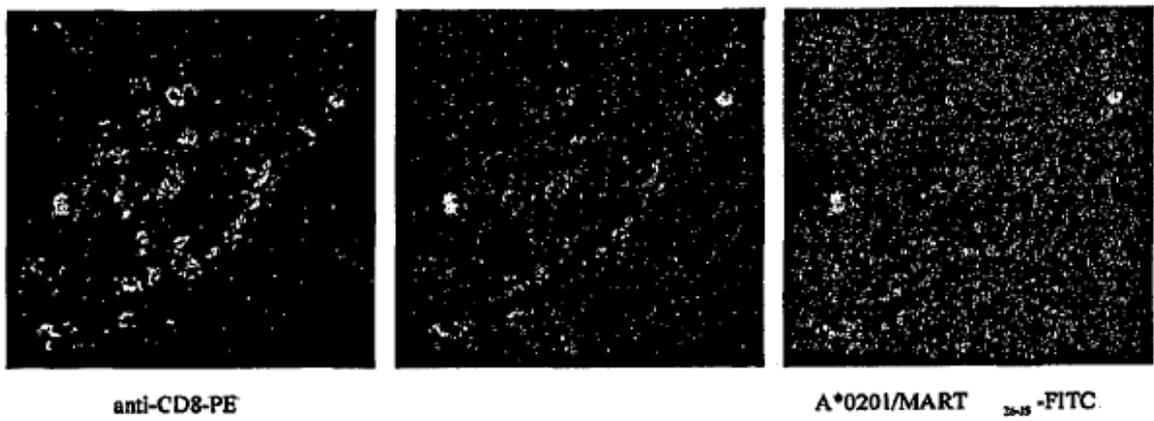


Figura 40

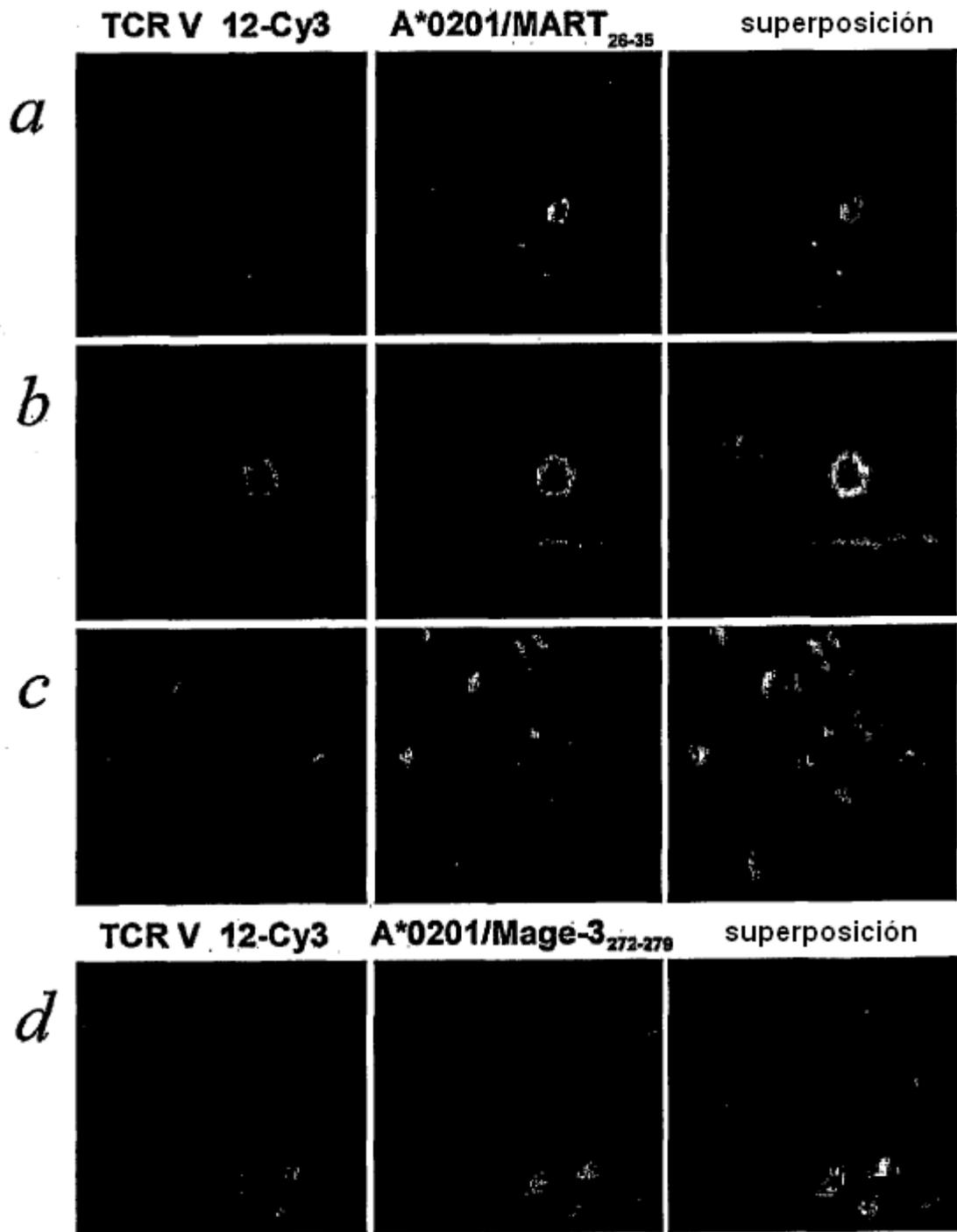


Figura 41

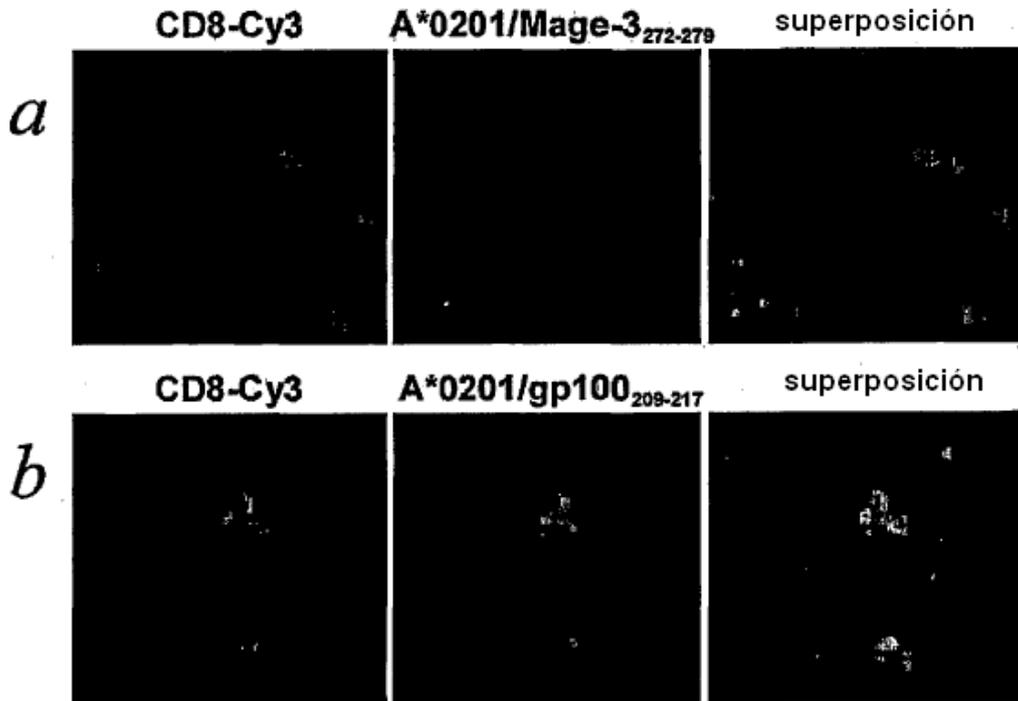


Figura 42

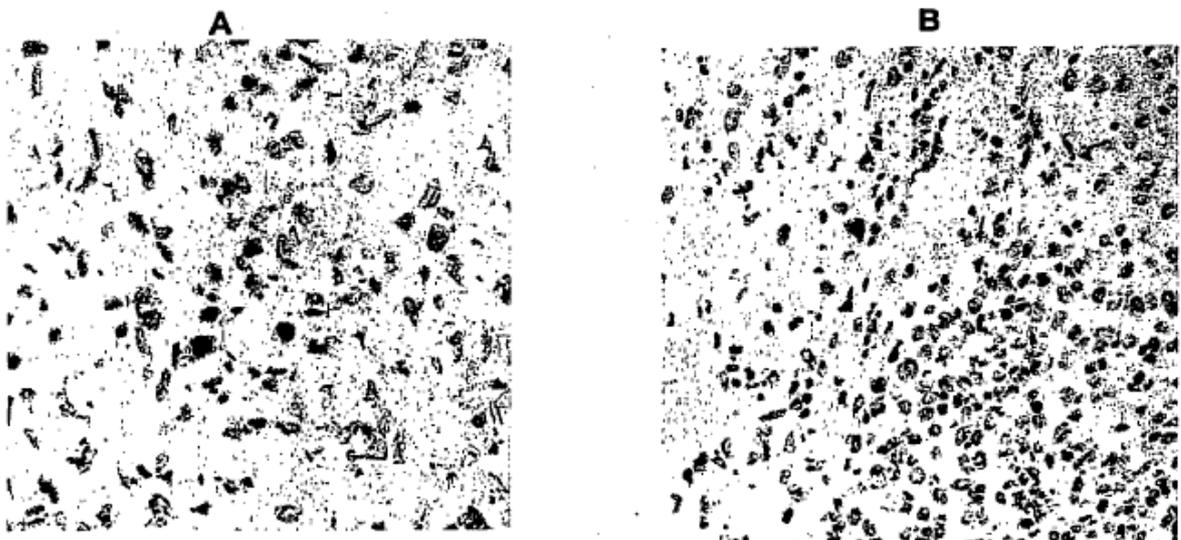


Figura 43

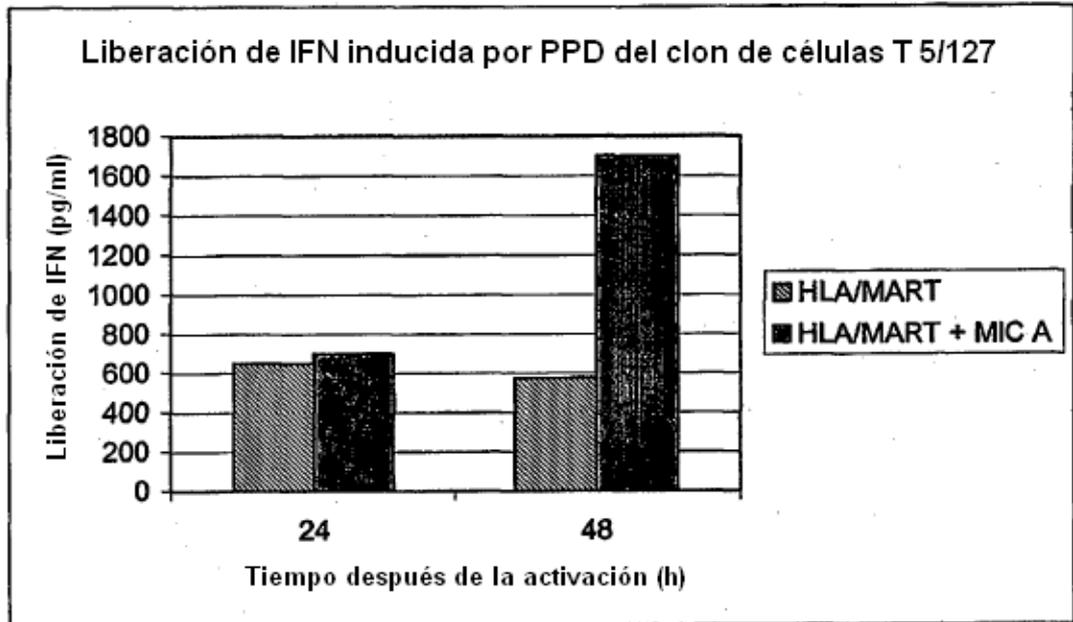


Figura 44

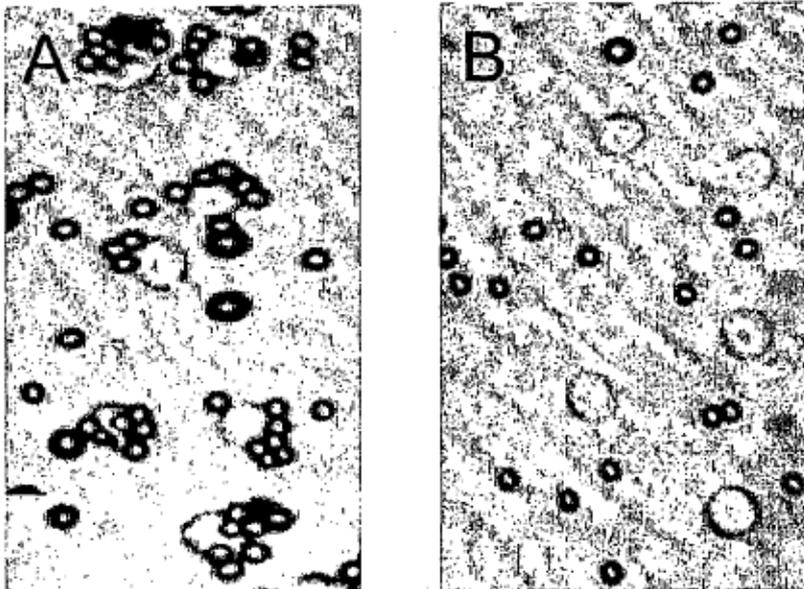


Figura 45

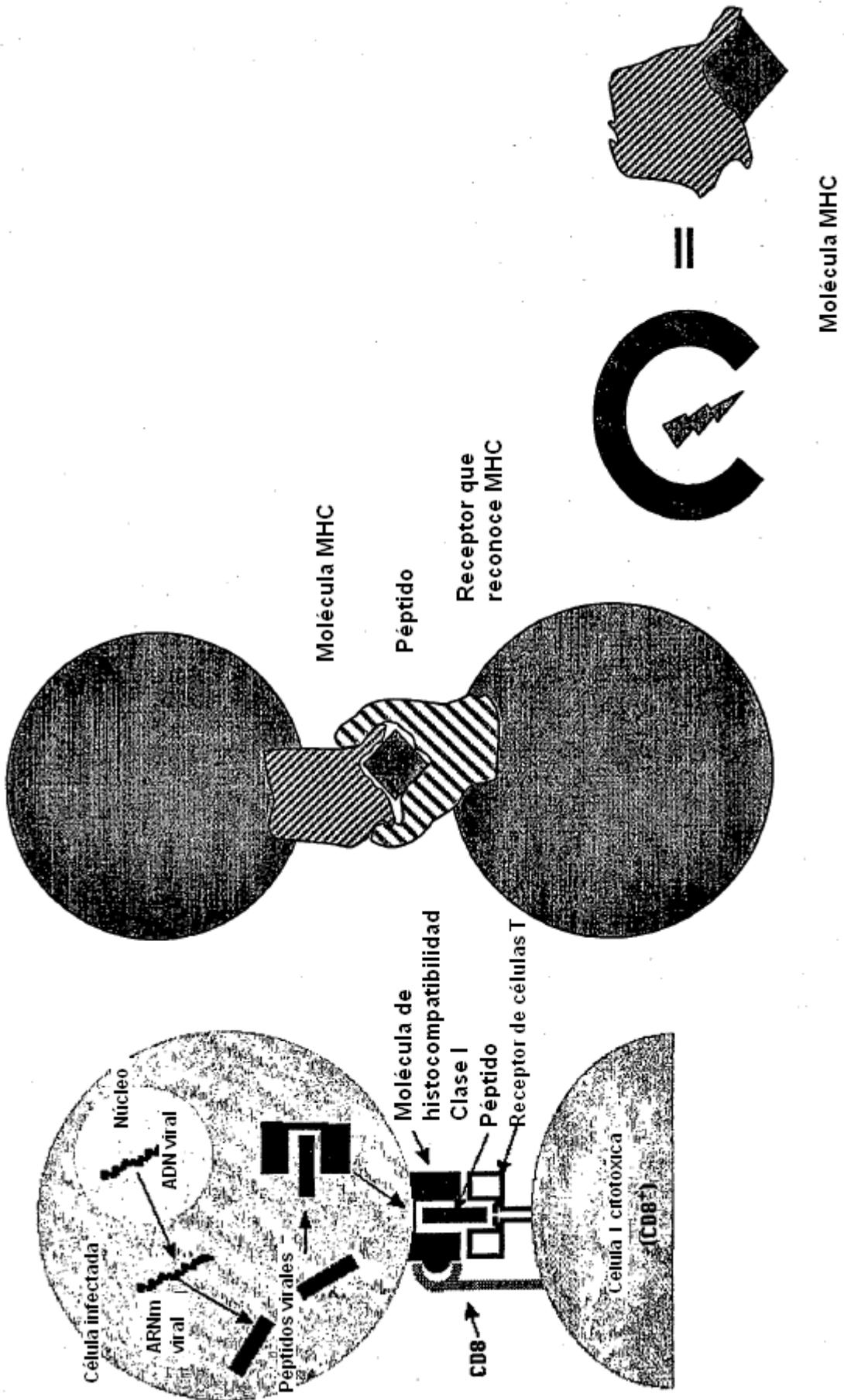


Figura 46

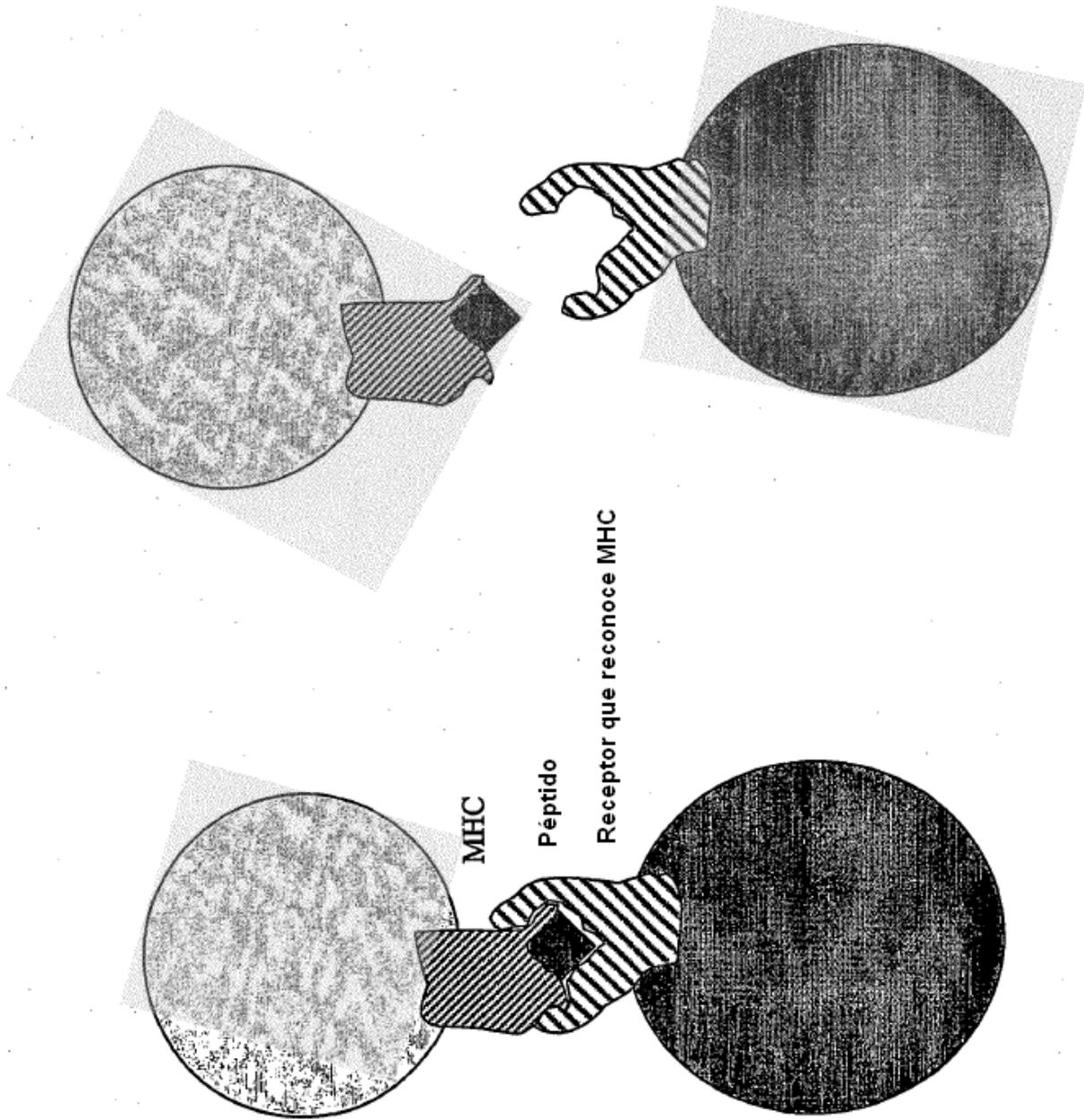


Figura 47

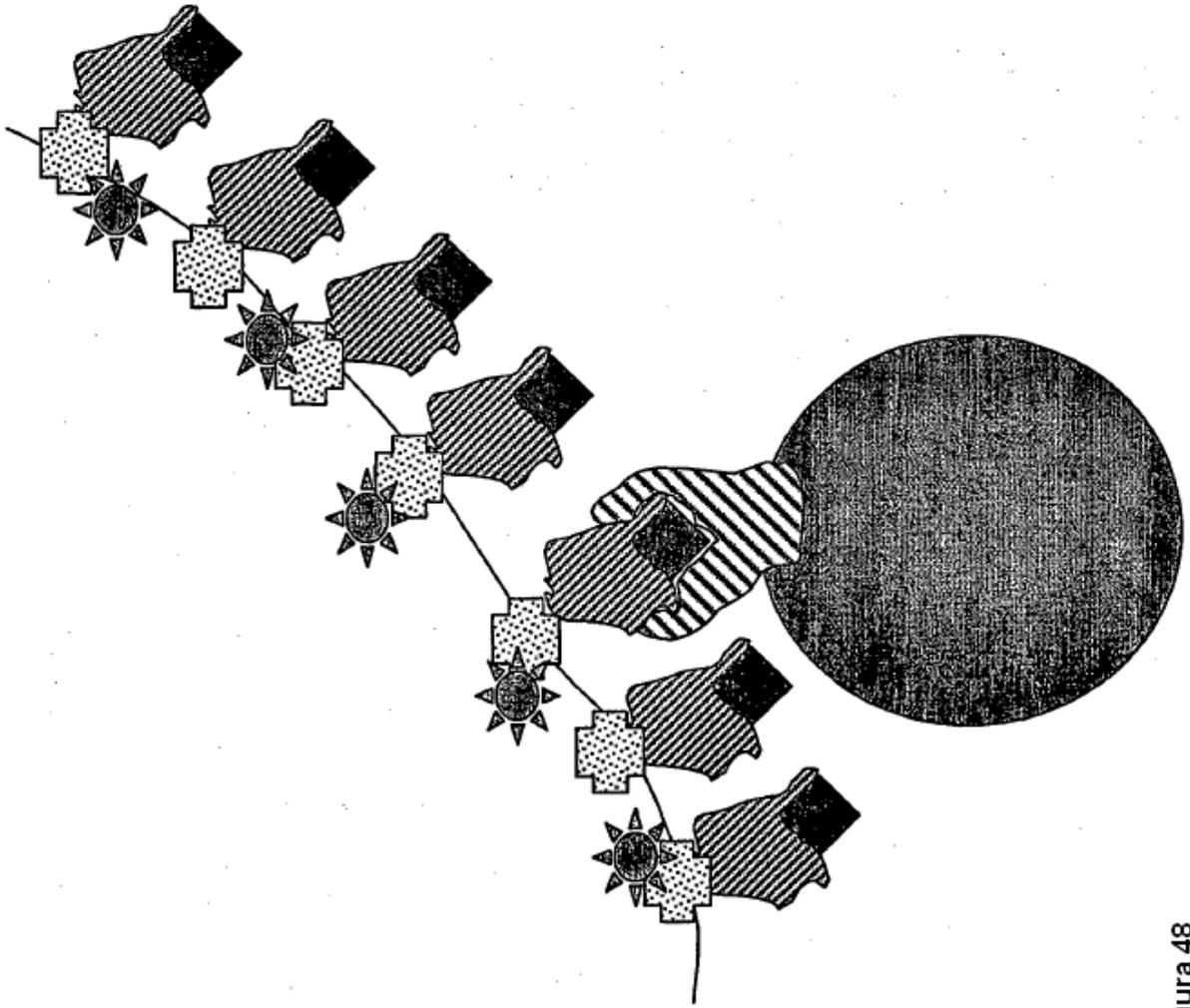
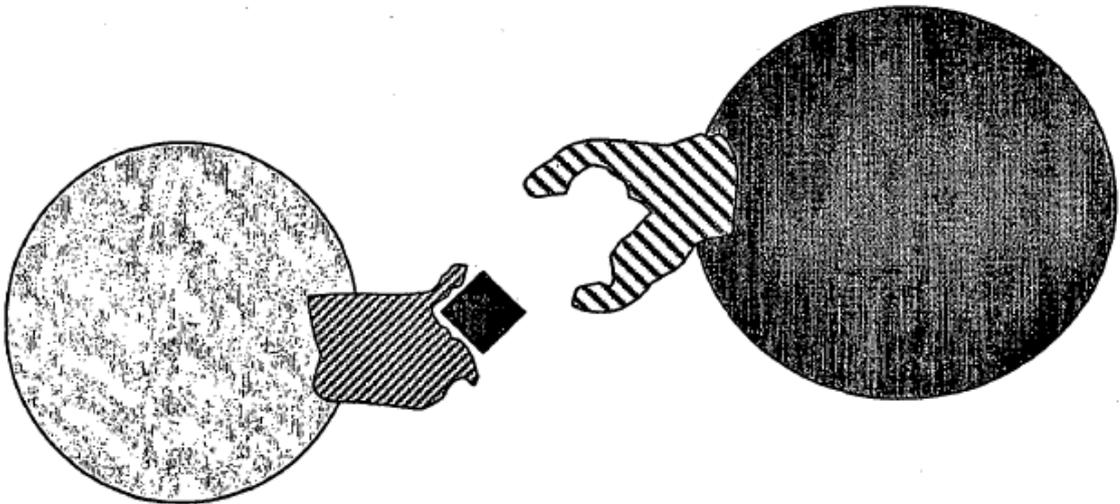
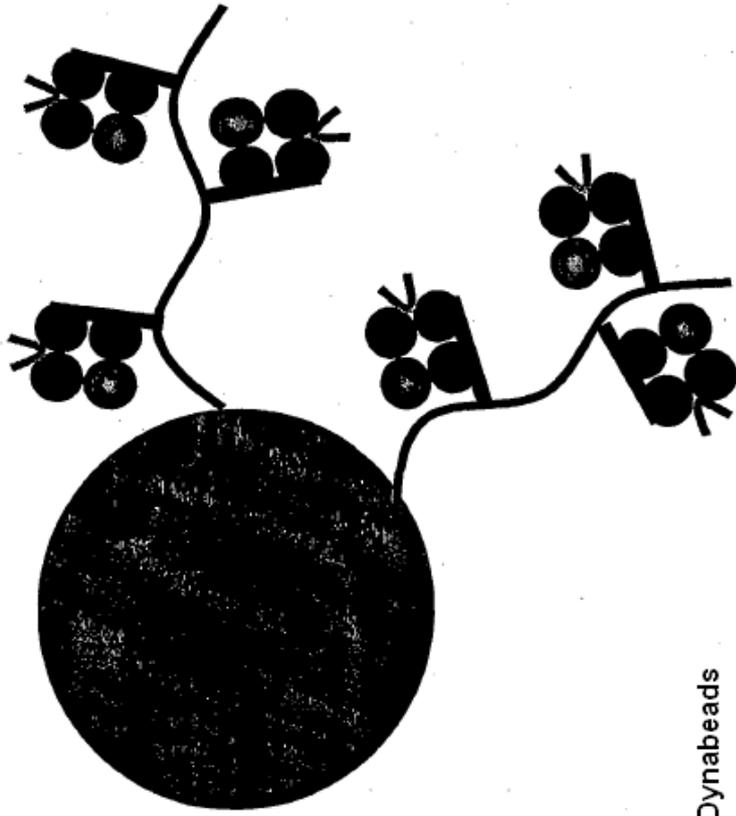


Figura 48





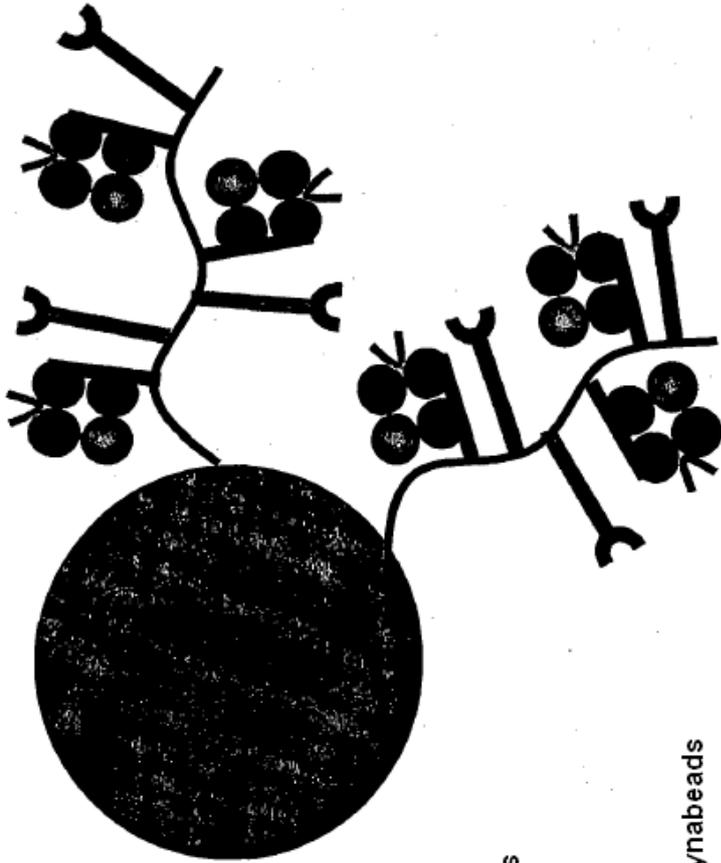
Fase sólida, por ejemplo, Dynabeads

Polimero tal como dextrano

HLA clase III con péptido

Moléculas HLA con péptidos
acopladas a polimeros en
fase sólida tal como Dynabeads

Figura 49



Moléculas co-estimuladoras
tales como CD80/CD86

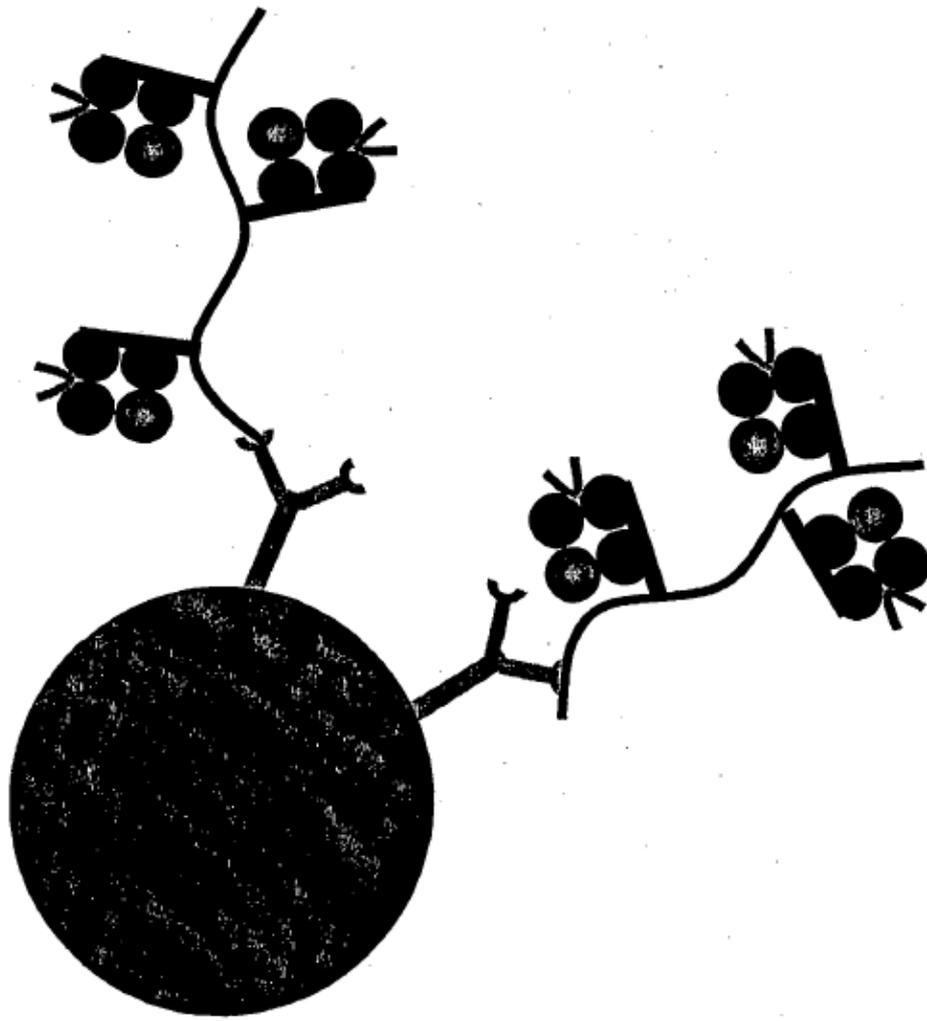
Fase sólida, por ejemplo, Dynabeads

Polímero tal como dextrano

HLA clase III con péptido

Moléculas HLA con péptidos
y moléculas co-estimuladoras
acopladas a polímeros en
fase sólida tal como Dynabeads

Figura 50



Anticuerpo dirigido
frente al polímero

Fase sólida
por ejemplo Dynabeads

Polímero tal como dextrano

HLA clase II/III

péptido

Figura 51

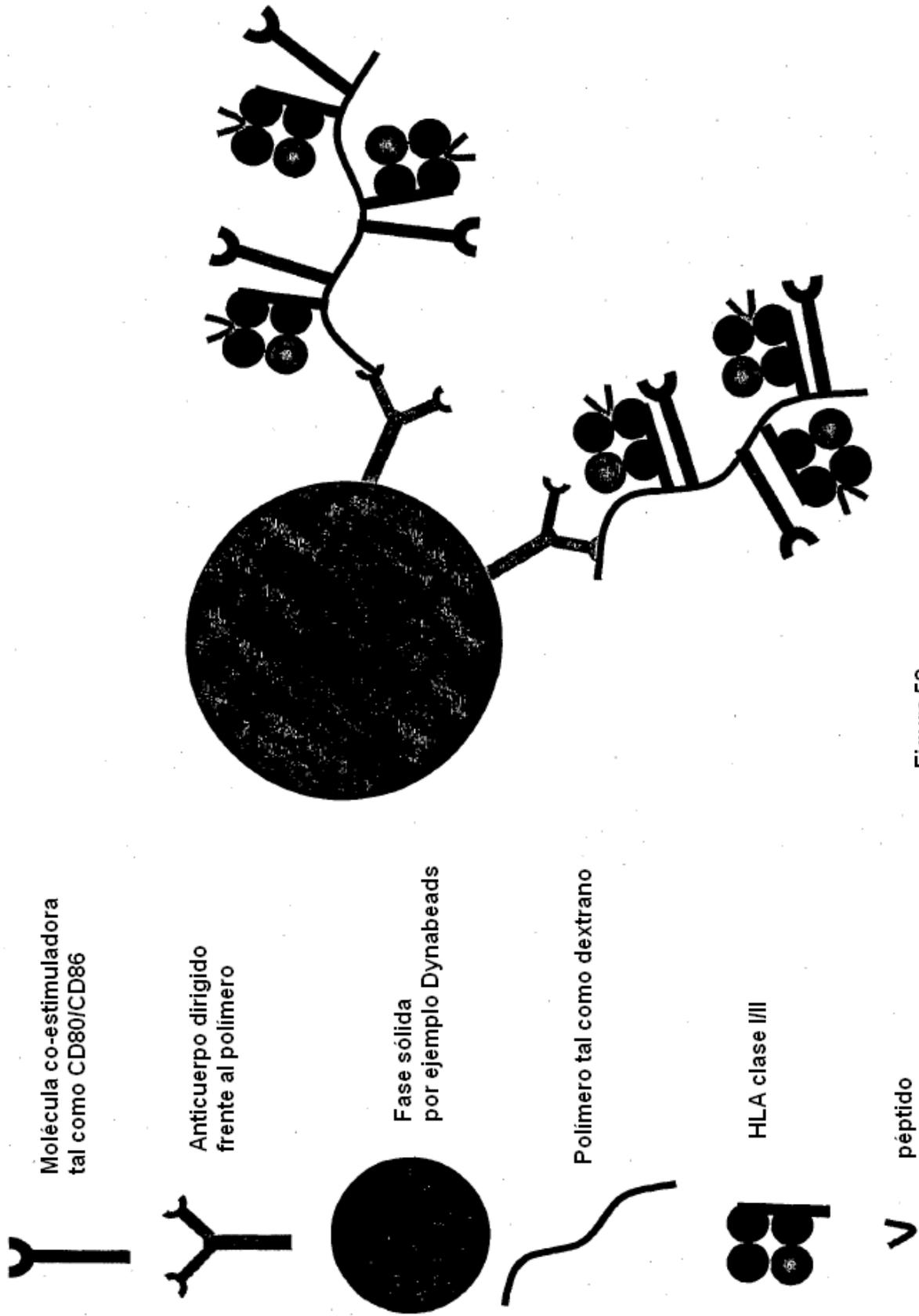


Figura 52

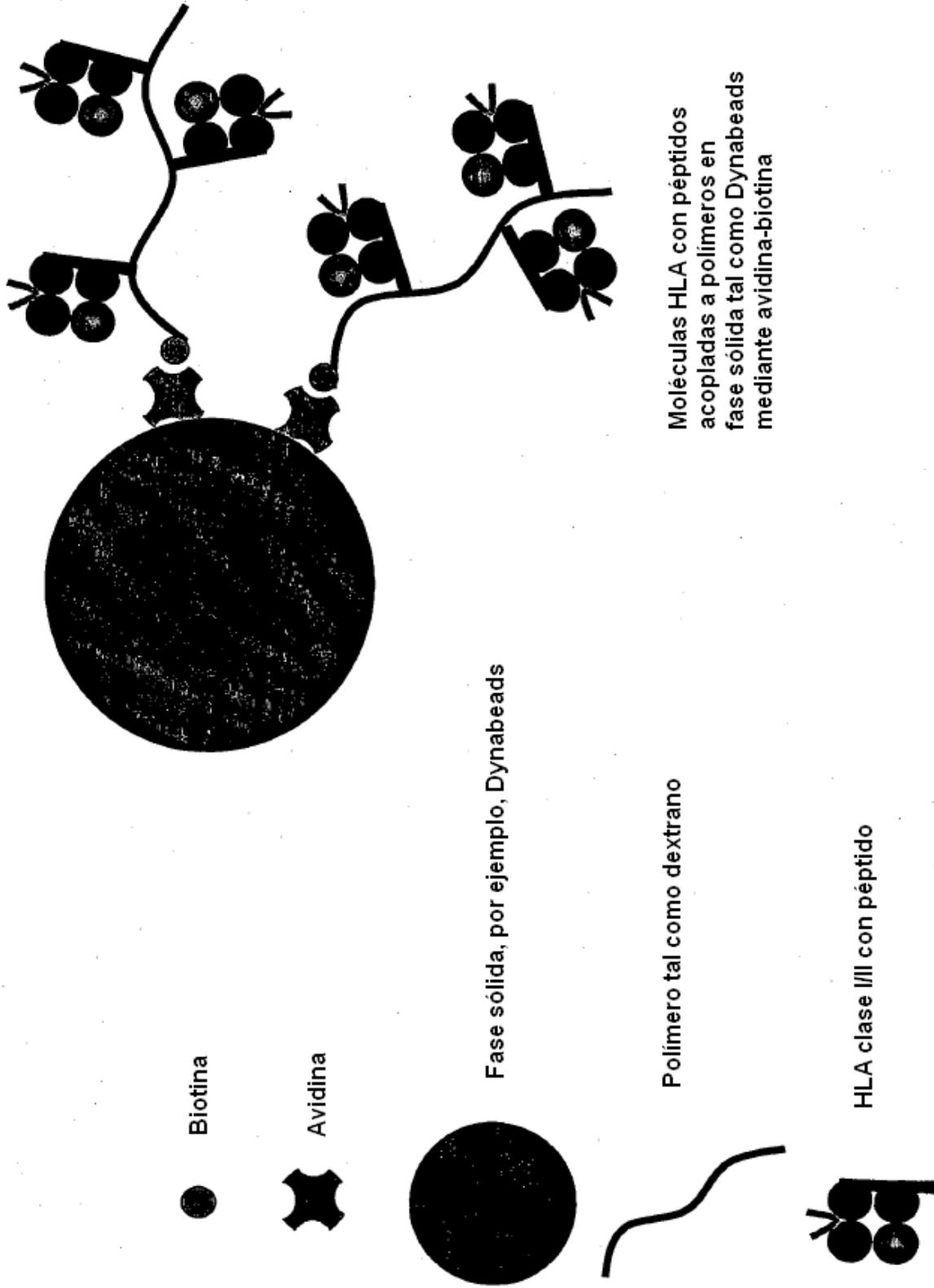


Figura 53

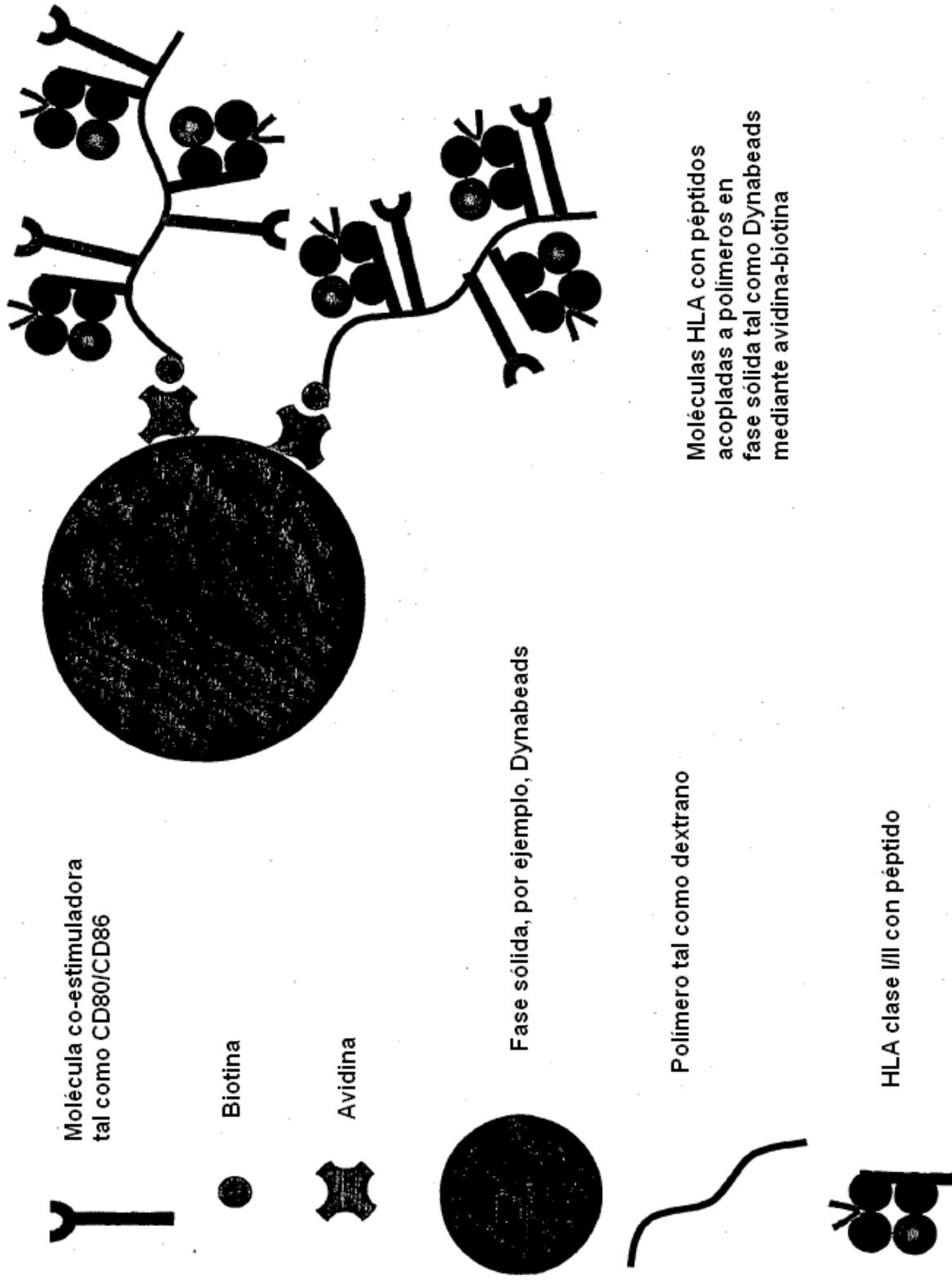


Figura 54

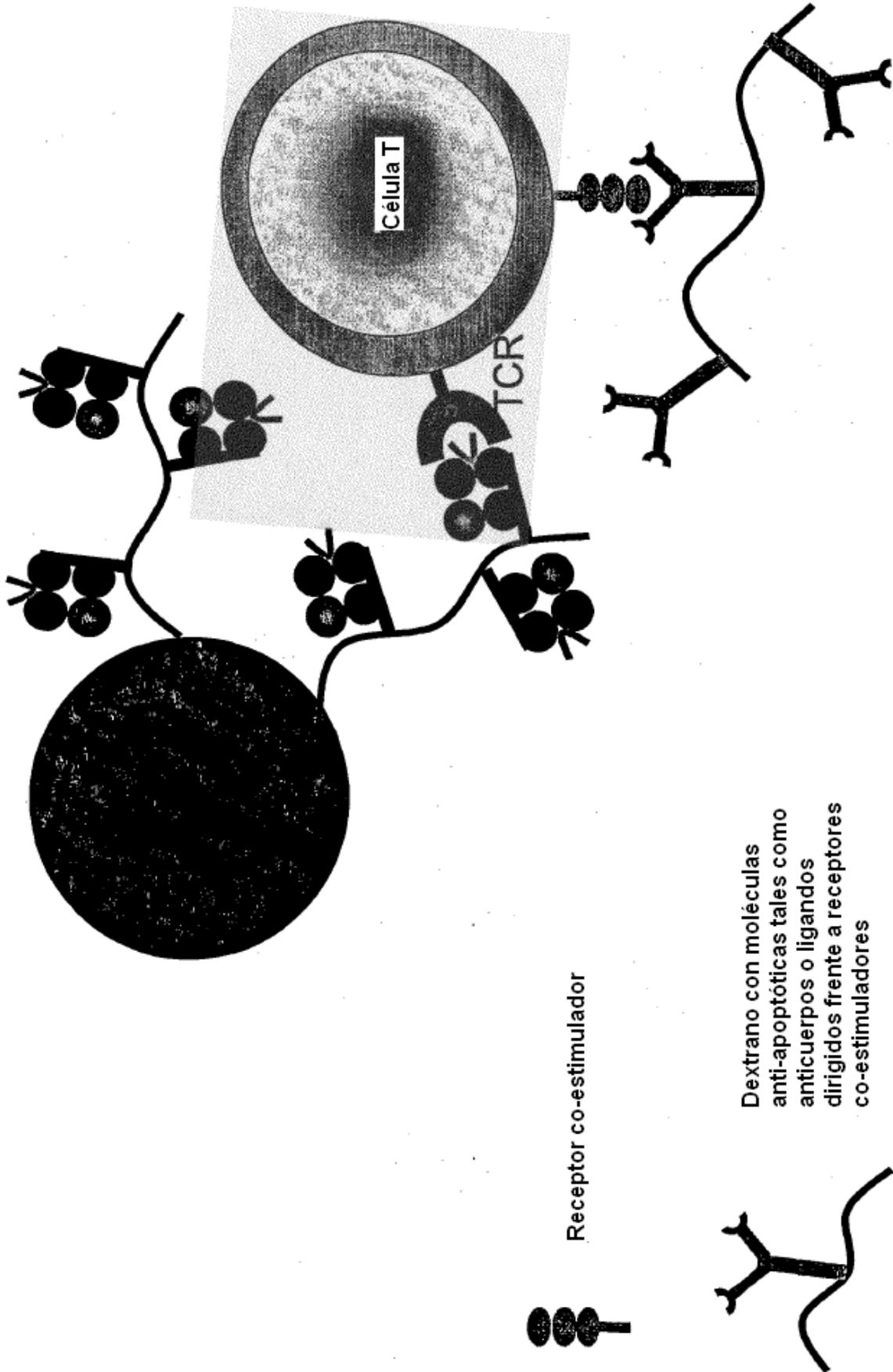


Figura 55

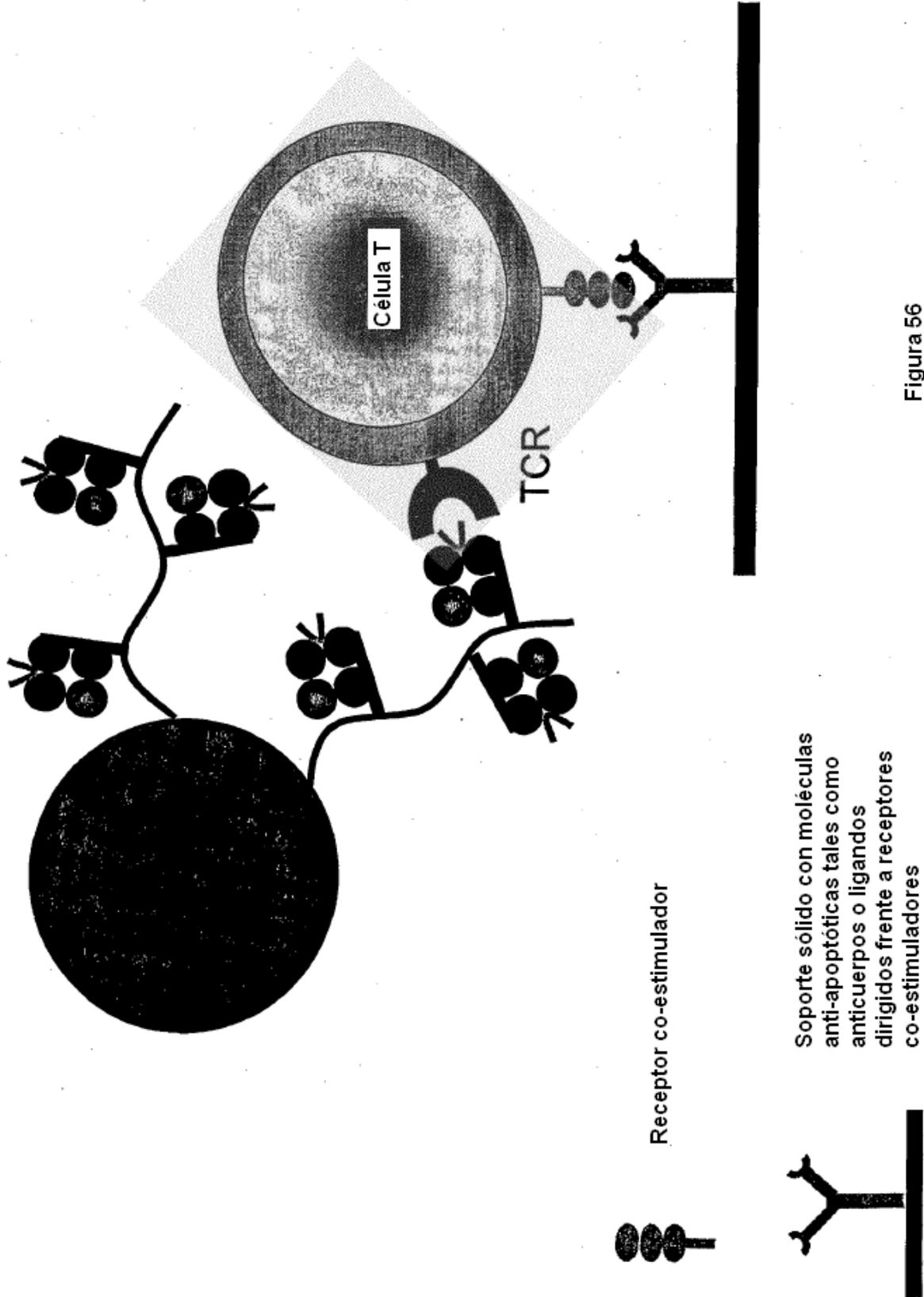


Figura 56

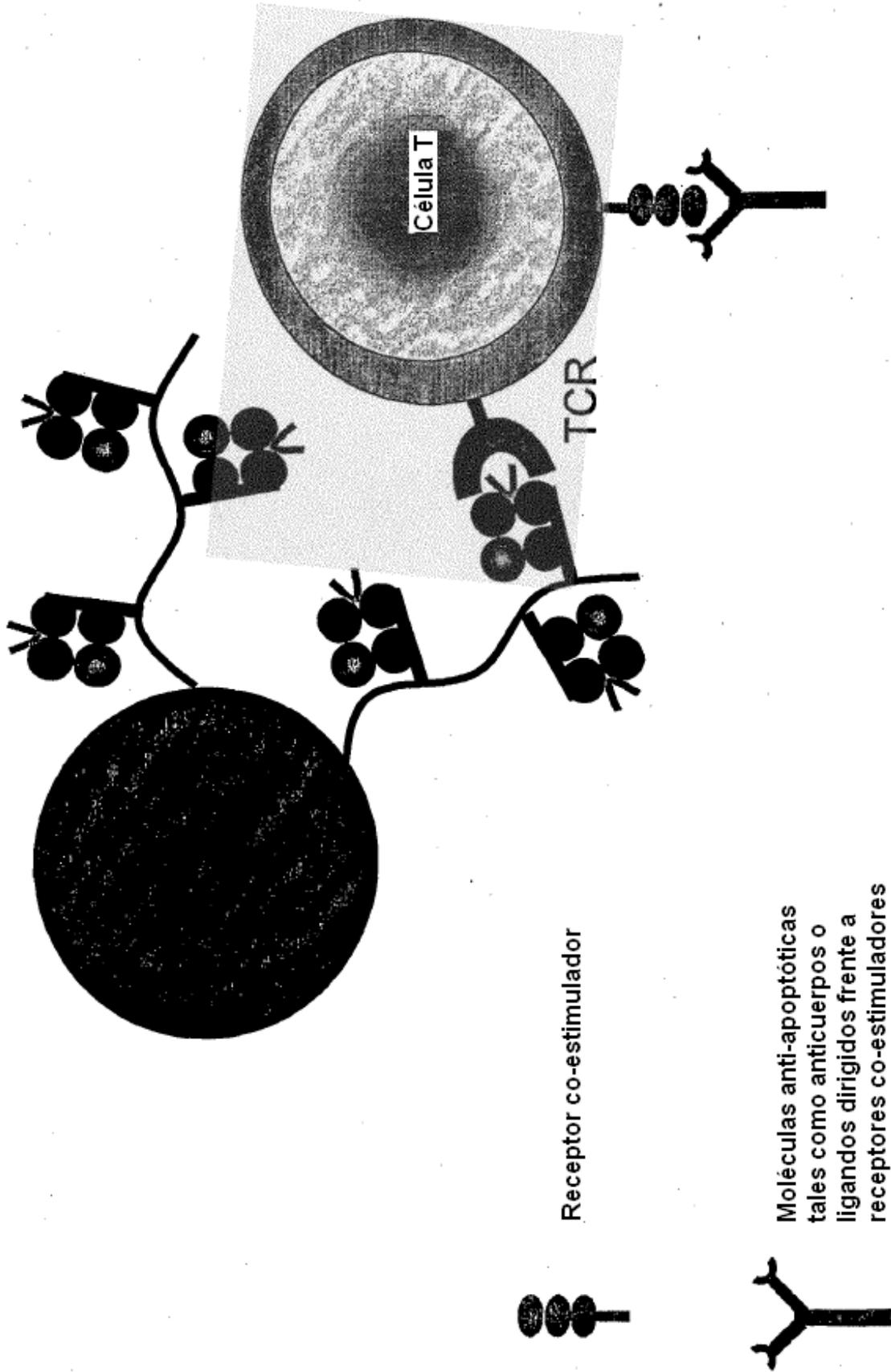


Figura 57