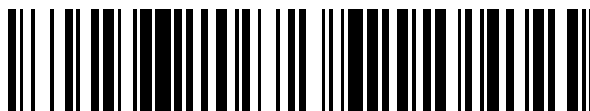


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 786**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2008** **E 08875010 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016** **EP 2362882**

54 Título: **Detección de células sensibles a antígenos en una muestra**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.05.2016

73 Titular/es:

**STICHTING SANQUIN BLOEDVOORZIENING
(50.0%)
Plesmanlaan 125
1066 CX Amsterdam, NL y
STICHTING HET NEDERLANDS KANKER
INSTITUUT (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HADRUP, SINE, REKER;
BAKKER, ARNOLD, HENDRIK;
SHU, CHENG YI, JENNY y
SCHUMACHER, ANTONIUS, NICOLAAS, MARIA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 568 786 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

Detección de células sensibles a antígenos en una muestra

Descripción

- 5 La presente invención se refiere a métodos para detectar células sensibles a antígenos en una muestra usando compuestos que presentan antígenos marcados multidimensionalmente, es decir, complejos mayores de histocompatibilidad (CMH). El presente método permite el análisis de alto rendimiento de células sensibles a antígenos específicos, tales como las células T, proporcionando de este modo, por ejemplo, métodos de alto rendimiento para el control de enfermedades o condiciones y el desarrollo de agentes inmunoterapéuticos, vacunas o la identificación de epítomos o secuencias de aminoácidos inmunogénicas.
- 10 Las células sensibles a antígenos, tales como las células T y las células B, son capaces de, entre otros, reconocer a las células infectadas por virus y a las células tumorales mediante el control de la presencia de complejos mayores de histocompatibilidad (CMH) específicos de péptidos de la enfermedad utilizando su receptor de células T específico de clon (RCT). El repertorio de los diferentes RCT expresados en el grupo combinado de células T humanas es enorme y se estima en alrededor de 25 millones (Arstila et al., 1999).
- 15 Para el control de las enfermedades o de las condiciones y el desarrollo de agentes inmunoterapéuticos o vacunas, es esencial ser capaz de detectar, identificar o aislar sólo aquellas células sensibles a antígenos específicos, tales como las células T y las células B, que reconocen, sin embargo, por ejemplo, el receptor de células T específicas de clon (RCT), un complejo CMH específico de antígeno (aCMH), tal como un complejo de péptido-CMH (pCMH), dentro de un gran grupo de células sensibles a antígenos irrelevantes, es decir, células que no comprenden el receptor específico de antígeno.
- 20 Como mostró por primera vez Altman et al., 1996, se pueden utilizar complejos pCMH multiméricos solubles acoplados a fluorocromos para detectar células T específicas de antígeno por citometría de flujo. El uso de estos multímeros de CMH fluorescentes se ha convertido en una piedra angular del control de células T tanto en la investigación como en la monitorización clínica.
- 25 Sin embargo, se da una limitación importante en el uso de la citometría de flujo para el multímero de CMH en la detección de respuestas de células T específicas de antígeno por el hecho de que sólo unas pocas especificidades antigénicas (y a menudo sólo una individual) se pueden monitorizar para una sola muestra biológica. Esta limitación se debe al número restringido de "canales", es decir, diferentes marcadores, tales como fluorocromos, que se pueden distinguir ya sea por sus espectros de excitación o de emisión o que pueden ser detectados por citometría de flujo, y esto constituye un severo límite en el número de respuestas de células T que pueden ser analizadas dentro de la cantidad restringida de material biológico, tal como una única muestra de sangre periférica, que es lo que está generalmente disponible.
- 30 Los materiales biológicos se analizaron, por ejemplo, para controlar respuestas inmunes de origen natural, tales como las que pueden ocurrir después de una infección o de un cáncer. Además, los materiales biológicos se analizan por su efecto en inmunoterapia, incluyendo vacunas o respuestas inmunes. La inmunoterapia, según se usa en este documento, se define como componentes activos en las intervenciones médicas que tienen como objetivo mejorar o suprimir las respuestas inmunes, incluyendo las vacunas, agentes estimulantes inmunes no específicos, agentes inmunodepresivos, agentes inmunoterapéuticos basados en células y combinaciones de los mismos.
- 35 Incluso con el reciente desarrollo de los puntos de cuánticos (Qdots) como nuevos fluorocromos inorgánicos y el constante aumento de las posibilidades de detección de múltiples parámetros de aparatos de citometría de flujo, el número máximo de diferentes poblaciones de células T analizadas en una sola muestra por tinción del multímero pCMH se mantiene en cuatro (Chattopadhyay et al., 2006).
- 40 El requisito para el desarrollo de tecnologías que permitan un análisis más completo de las respuestas de células T específicas de antígeno es subrayado por el hecho de que varios grupos han tratado de desarrollar las llamadas micromatrices de CMH. En estos sistemas, la especificidad de las células T no está codificada por fluorocromos, pero está codificada espacialmente (Soen et al., 2003; y Stone et al., 2005). A pesar de su potencialidad, las micromatrices de CMH no han sido adoptadas ampliamente y no hay ejemplos disponibles documentados por su valor en la medición multiplexada de respuestas de células T, por ejemplo, en la identificación de epítomos.
- 45 Se han utilizado sistemas de codificación combinatorios en una serie de configuraciones para aumentar el número de análisis que se pueden realizar en una sola muestra. Un ejemplo específico en el campo de los Qdots consiste en el uso de microperlas con código de Qdot para llevar a cabo el genotipado (Xu et al., 2003). Además, la codificación combinatoria se ha utilizado para medir productos de suero tales como citoquinas utilizando matrices de perlas en las que la codificación se lleva a cabo por la variación del tamaño de la perla, por el fluorocromo y por la intensidad del fluorocromo (por ejemplo, las matrices de perlas de citometría de BD). En todos estos ejemplos, los solutos se analizan mediante la unión de microperlas pre-codificadas.
- 50
- 55

Bakker et al. (2008; PNAS vol. 105, No. 10 pp. 3825-3830) describe la tecnología de intercambio del ligando de CMH de clase 1 condicional y del péptido para los productos génicos de CMH humanos HLA-A1, -A3, -A11 y -B7. Se describe el uso de estrategias de intercambio del péptido de CMH para tanto el descubrimiento del epítomos de células T grandes y la monitorización de células T.

- 5 Bakker et al. (2005; Current Opinion in Immunology, vol. 17, pp. 428-433) describe la detección de alto rendimiento de respuestas de células T y sugiere la facilidad de manipulación de las respuestas de células T mediante el uso de reactivos de MHC multiméricos.

10 Considerando lo anterior, sigue existiendo una necesidad en la técnica de métodos que permitan la detección, el aislamiento y/o la identificación de células sensibles a antígenos específicos, tales como las células T específicas de antígeno, en la forma de alto rendimiento.

Además, sigue habiendo una necesidad en la técnica, teniendo en cuenta las cantidades a menudo limitadas de muestra disponible, para los métodos que permiten la detección, el aislamiento y/o la identificación de múltiples especies de células sensibles específicas de antígenos, tales como las células T, en una sola muestra.

- 15 Por lo tanto, un objetivo de la presente invención, entre otros, es proporcionar métodos para detectar múltiples especies de células específicas de antígeno en cantidades relativamente pequeñas de material biológico, tal como en una sola muestra, por ejemplo, una única muestra de sangre periférica, preferiblemente en una forma de alto rendimiento.

Este objetivo, entre otros, se cumple mediante un método como se define en la reivindicación adjunta 1.

- 20 Específicamente, este objetivo se cumple mediante un método para la detección de células sensibles a antígenos en una muestra (de material biológico tal como una muestra de sangre periférica) que comprende:

- proporcionar, tal como mediante una carga, compuestos que presenten antígenos, es decir, complejos mayores de histocompatibilidad (CMH), que lleven al menos un marcador, con tres o más antígenos predeterminados, en el que cada antígeno se representa (se codifica) por al menos dos marcadores diferentes;

- poner en contacto dicho compuestos que presentan antígenos proporcionados con antígenos con dicha muestra;

- 25 - detectar la unión de dichos compuestos que presentan antígenos cargados con antígenos a dichas células sensibles a antígeno, detectando así las células sensibles a dicho antígeno;

en el que dichas células sensibles a antígenos son células T, y el que dicho antígeno se detecta mediante la detección de la presencia de dichos al menos dos marcadores diferentes unidos a una célula sensible a antígeno a través de dichos complejos mayores de histocompatibilidad (CMH) cargados con dicho antígeno.

- 30 Los tres o más antígenos anteriores predeterminados se pueden seleccionar a partir del grupo que consta de cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, diez o más, once o más, doce o más, trece o más, catorce o más, quince o más, dieciséis o más, diecisiete o más, dieciocho o más, diecinueve o más, veinte o más, veintiuno o más, veintidós o más, veintitrés o más, veinticuatro o más, veinticinco o más, veintiséis o más, veintisiete o más, y veintiocho o más.

- 35 La presente invención extiende el concepto de codificación combinatoria por el análisis de los códigos combinatorios que se forman a través de la unión de combinaciones definidas de compuestos que presentan antígenos.

Específicamente, la presente invención se basa en el descubrimiento de que se puede analizar un gran número de respuestas de células específicas de antígeno de forma simultánea, y en una sola muestra, a través de la utilización de compuestos que presentan antígenos que están cada uno acoplado a una combinación única de marcadores, tales como fluorocromos, siendo usado el mismo marcador muchas veces, pero cada vez en una combinación única con uno u otros más marcadores, tales como fluorocromos.

- 40 En contraste con la técnica anterior, esto implica la creación de novo de un código específico para el ensayo; esto implica un análisis sobre las células en lugar de sobre los solutos; y esto implica el uso de codificación combinatoria para el análisis paralelo de las respuestas de células específicas de antígeno.

- 45 Los datos obtenidos muestran que, a pesar de la opinión generalizada de que las células específicas de antígeno presentan una alta reactividad cruzada, la detección de células mediante codificación combinatoria es una posibilidad práctica y realista. El valor de la codificación combinatoria se ejemplifica de acuerdo con la presente invención mediante la disección de las respuestas de células T específicas de antígeno asociadas a melanoma en sangre periférica de pacientes con melanoma.

- 50 El trabajo previo ha demostrado que es factible detectar células T específicas de antígeno mediante la unión de dos multímeros de CMH que contienen al mismo, o un péptido relacionado, por lo tanto, la detección de un único antígeno en una sola muestra, que estén ambos acoplados a un fluorocromo diferente. Se ha usado esta tecnología

de doble tinción del multímero de CMH para revelar la especificidad fina de las células T específicas para (variantes de) epítomos peptídicos individuales (Haanen et al., 1999).

Según la presente invención, el término "antígeno" indica un péptido inmunogénico o polipéptido que se reconoce por el sistema inmune como "ajeno" o heterólogo.

5 El presente inventor contempla que si un gran conjunto de tales pCMH codificados de dos colores se pudiera combinar en una sola muestra sin interferir con la capacidad de detectar células T específicas para una de estos pCMH, una tecnología de este tipo podría concebiblemente ser utilizada para codificar un número mucho mayor de especificidades de células T que son posibles con una sola codificación clásica de color.

10 En esta configuración, una población específica de células T ya no se definiría por una sola señal fluorescente, como es el caso de las tinciones de multímeros de pCMH de la técnica anterior, sino que su especificidad clonal se visualizaría mediante la unión de dos fluorocromos predeterminados y no cualquiera de los otros fluorocromos, solos o en combinación, que estén presentes. La potencia de dicho esquema de codificación combinatorio se hace cada vez más evidente con un número creciente de fluorocromos disponibles.

15 Como ejemplo, en una configuración donde se pueden utilizar 3 fluorocromos para codificar, se pueden utilizar ambos sistemas de codificación simple y doble para revelar tres identidades diferentes ('A', 'B', y 'C' en el caso de la codificación de un solo color y 'A-B', 'A-C' y 'B-C' en el caso de la codificación de dos colores). En el caso de que fueran utilizados 8 fluorocromos para codificar, un sistema de codificación simple y doble puede suministrar 8 y 28 códigos únicos, respectivamente. En el caso de que se usen 17 fluorocromos (el número máximo de diferentes fluorocromos disponibles actualmente para un solo análisis por citometría de flujo), un sistema de codificación solo produciría 17 códigos únicos, mientras que un sistema de codificación dual podría abarcar hasta 136 identidades diferentes.

20 Aunque la presente invención ejemplifica la codificación combinatoria bidimensional, es decir, dos fluorocromos para la codificación de un solo antígeno, tres o un orden superior, tales como cuatro y cinco, la codificación combinatoria funciona por el mismo principio y es particularmente atractiva con un número de fluorocromos disponibles cada vez mayor. Para ilustrar esto, en el último ejemplo, en el que se utilizan 17 fluorocromos, los esquemas de codificación de orden más alto permiten la codificación de muchos miles de especificidades únicas.

25 Uno de los factores clave que determinan si la codificación combinatoria anterior estaría disponible en una sola muestra es la capacidad de medir las células sensibles a antígenos mediante la interacción con varios marcadores en un caso en el que los marcadores se utilizan varias veces y se conjugan con compuestos que presentan distintos antígeno-antígeno múltiples. El uso de el mismo marcador conjugado con compuestos que presentan distinto antígeno-antígeno aumenta inherentemente la posibilidad de que las células sensibles a antígeno puedan marcarse mediante compuestos presentan antígenos-antígenos distintos, destruyendo así la posibilidad de revelar su respuesta frente al antígeno por códigos tales como los proporcionados en la Tabla 1 más abajo.

30 Contrariamente a la opinión generalizada de que las células T tienen una alta reactividad cruzada, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que el uso múltiple del mismo marcador conjugado con compuestos que presentan distintos antígeno-antígeno permite realmente la detección de células sensibles a antígenos.

35 Otro de los factores clave que determinan si la codificación combinatoria anterior estaría disponible en una sola muestra es el poder de discriminación del método, o, en otras palabras, la capacidad de detectar por separado cada combinación individual de marcadores, tales como fluorocromos. El uso de un marcador, tal como un fluorocromo, ofrece inherentemente una señal de fondo por debajo de la cual no es posible la detección específica. De esto se deduce que inherentemente la señal de fondo aumentaría, por lo tanto el límite de detección, cuando se utilizan dos marcadores, y habría aumentos adicionales utilizando tres marcadores, etc.

40 Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que, en contraste con la disminución esperada en poder de discriminación debida a un aumento en la señal de fondo (no específica), la codificación de múltiples antígenos usando tres o más marcadores, tales como fluorocromos, disminuye la señal de fondo con un factor de tanto como de 10 en un sistema de codificación de antígeno de 2 marcadores, permitiendo de este modo un aumento sustancial de la sensibilidad del sistema. Debido a este aumento de la sensibilidad del sistema, múltiples detecciones de antígenos, es decir, la detección de células sensibles a antígenos de múltiples especies se ha convertido en una posibilidad, proporcionando de este modo el método de acuerdo con la presente invención.

45 Además, entre otros, debido a la disminución de arriba observada en la señal de fondo, con el consiguiente aumento de la sensibilidad, la influencia negativa esperada en la sensibilidad del ensayo debida a la unión no específica del compuesto que presenta el antígeno se reduce significativamente, proporcionando de ese modo adicionalmente el método según la presente invención.

50 De acuerdo con una realización preferida del presente método, los compuestos que presentan antígeno se proporcionan con un marcador y el antígeno se representa, o es codificado, por al menos dos compuestos que presentan antígenos marcados de forma diferente.

En otras palabras, de acuerdo con esta realización preferida, cada antígeno individual (o epítipo) que se detecta se carga en al menos dos compuestos que presentan antígenos que tienen cada uno un marcador diferente detectable, tales como diferentes fluorocromos que emiten fluorescencia.

5 Se proporcionan los compuestos que presentan antígeno con al menos dos marcadores diferentes, tales como tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho, por ejemplo, conjugados o unidos covalentemente a los CMH, y el antígeno se representa (o está codificado) por uno compuesto que presenta antígeno múltiplemente marcado.

En otras palabras, cada antígeno individual (o epítipo) que se detecta se carga en un solo compuesto que presenta antígeno provisto de al menos dos marcadores diferentes, tales como diferentes fluorocromos que emiten fluorescencia.

10 El antígeno de acuerdo con la presente invención es preferiblemente un péptido. Este péptido puede representar un epítipo inmunogénico ya conocido de, por ejemplo, un virus o una célula tumoral, lo que permite, por ejemplo, la detección de la presencia de las células inmunes sensibles a este antígeno y el posterior diagnóstico de una infección viral o cáncer.

15 El presente péptido también puede representar un epítipo desconocido y la detección de células que responden a este epítipo es indicativa de la presencia de una secuencia de aminoácidos inmunogénica dentro de este péptido permitiendo de este modo la identificación de regiones inmunogénicas o epítipos en, por ejemplo, un polipéptido.

20 Los compuestos que presentan antígenos de acuerdo con la presente invención preferiblemente unen el antígeno al marcador o a los marcadores adjuntos. Los compuestos que presentan antígeno de acuerdo con la presente invención son los complejos mayores de histocompatibilidad (CMH) y, más preferiblemente, los complejos mayores de histocompatibilidad multiméricos (CMH), preferiblemente cuatro o más. Los compuestos que presentan antígenos contribuirán preferiblemente con fuerza a, por lo tanto, aumentar la interacción entre el antígeno y la célula sensible al antígeno.

25 El uso de los complejos mayores de histocompatibilidad (CMH) es ventajoso, no sólo debido a que estos compuestos son naturalmente capaces de la presentación del antígeno, sino también porque están disponibles tecnologías fácilmente disponibles para proporcionar los presentes compuestos que presentan antígenos marcados para uso en el presente método (Rodenko et al., 2006).

Los marcadores según la presente invención son preferiblemente marcadores fluorescentes, más preferiblemente marcadores fluorescentes, designados en la técnica como Qdots.

30 De acuerdo con una realización preferida del presente método, el número de diferentes marcadores utilizados en un único ensayo se selecciona del grupo que consiste en tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, y ocho o más.

35 De acuerdo con todavía otra realización preferida, cada antígeno individual está representado por al menos tres o al menos cuatro marcadores diferentes. Mediante el uso de tres o más, o incluso cuatro o más, marcadores, tales como Qdots, para codificar un único antígeno, el número de células sensibles a antígenos potenciales que se detectan en una sola aumenta drásticamente. Esto se ejemplifica en la figura 1, que muestra el número de canales disponibles, o combinaciones, disponibles para codificar, o representar a un solo antígeno.

40 Si bien un único marcador que codifica un antígeno solo permitiría la discriminación de tantas especies de células sensibles a antígenos como el número de marcadores disponibles, que codifica el mismo antígeno por dos, tres o cuatro marcadores, aumenta drásticamente el número de especies de células que representan antígenos que se pueden detectar.

Según la presente invención, el presente método se realiza preferiblemente en una sola muestra, en el que la muestra es preferiblemente una muestra de sangre.

45 Tal como se define en el presente documento, la expresión "muestras de sangre" no se limita a las muestras de sangre directamente obtenidas de un individuo, sino también a muestras derivadas, o procedentes de, una muestra de sangre obtenida directamente, bajo la restricción de que estas muestras derivadas todavía comprenden las células sensibles a antígeno originalmente presentes.

De acuerdo con una realización particularmente preferida del presente método, la detección de células sensibles a antígeno comprende el análisis por citometría de flujo.

50 Teniendo en cuenta lo anterior, se describe el uso de los presentes al menos dos marcadores que representan un antígeno individual para la detección de células sensibles a antígeno en una muestra.

Se describe también el uso del presente método para el diagnóstico de enfermedades o afecciones tales como el cáncer, el uso del método presente para el desarrollo de agentes inmunoterapéuticos y el uso del presente método para el desarrollo de vacunas.

El presente método también puede usarse para la identificación de epítomos, o secuencias de aminoácidos inmunogénicas, en un polipéptido, como se ejemplifica en la identificación descrita más abajo de los antígenos de células T asociados a HLA-A3 desconocidos: QLRALDGGNK, SLYRDPLPR, HAYIQSLLK, RMYNMVPPF y GTYEGLLRR utilizando el método de acuerdo con la presente invención.

- 5 De acuerdo con ello, se describen antígenos de células T asociadas a HLA-A3 seleccionados del grupo que consiste en QLRALDGGNK, SLYRDPLPR, HAYIQSLLK, RMYNMVPPF y GTYEGLLRR; el uso de los antígenos de células T asociadas a HLA-A3 descritos, o derivados funcionales de los mismos, en el control de la inmunoterapia y en vacunas; y el uso de los antígenos de células T asociadas a HLA-A3 descritos, o derivados funcionales de los mismos, en el desarrollo de inmunoterapia y de vacunas.
- 10 Los principios de la presente invención serán más detallados en los ejemplos que muestran realizaciones preferidas de la presente invención. En los ejemplos, se hace referencia a las siguientes figuras en las que:

Figuras

15 Figura 1: muestra el número teórico de combinaciones de color único que se pueden hacer usando un número creciente de fluorocromos en los esquemas de codificación ya sea de 1 como de 2 dimensiones (izquierda) o de 1-4 dimensiones (derecha).

Figura 2: muestra las 28 combinaciones de color único que se pueden utilizar para codificar un antígeno utilizando una matriz bidimensional de 8 fluorocromos.

20 Figura 3: muestra la reducción de la señal de fondo mediante el uso de multímeros de pCMH codificados de dos colores. Barras grises: PBMC teñidas con 25 diferentes combinaciones codificadas de color dual de multímeros de CMH que contienen ya sea el epítomo CMV_{NLV} ('CMV') o el control péptido p* (fondo). Barras negras: PBMC teñidas con los 8 multímeros diferentes de CMH codificados de un solo color (PE, APC, Q565, Q585, Q605, Q655, P705 y Q800) que contienen ya sea el epítomo CMV_{NLV} ('CMV') o el control péptido p* ('Línea de fondo').

Figura 4: muestra una vista general esquemática de la estrategia de clasificación utilizada para la identificación de células T específicas de pCMH después de la tinción con multímeros de pCMH codificados de dos colores.

25 Figuras 5-7: muestra la detección múltiple de respuestas de células T específicas de virus a través de la codificación combinatoria. Las respuestas de células T específicas de virus se analizaron en PBMC de tres donantes sanos: I) mediante la tinción de una muestra con una mezcla de 25 multímeros pCMH diferentes, cada uno codificado por un código de dos colores; II) mediante la tinción de 25 muestras individuales con multímeros pCMH que contienen uno de los 25 péptidos acoplados a un código de doble color específico; III) mediante la tinción de 25 muestras individuales con multímeros CMH marcados con PE clásicos que contienen uno de los 25 péptidos; y IV) mediante la tinción de una muestra con una mezcla de multímeros pCMH irrelevantes cada uno codificado por un código de doble color. I-IV: diagramas de puntos de poblaciones de células T específicas de antígeno detectadas a una frecuencia > 0,03% en 'I. V: Representación gráfica de la frecuencia de células T CD8⁺ específicas de antígeno dirigidas contra los 25 epítomos utilizados (Tabla 1 Supl.), como se detecta por tinción del multímero CMH marcado con PE (■); por multímeros CMH codificados de doble color con 25 especificidades por muestra (◆); por multímeros CMH codificados de doble color con una especificidad de pCMH por muestra (▲); por multímeros CMH codificados de doble color cargados con un péptido control (◇).

30

35

40 Figura 8: muestra la correlación entre los diferentes enfoques de tinción de las células T. La correlación entre las frecuencias de células T específicas de antígeno como se detectó por la tinción clásica del multímero CMH marcado con PE (eje X) y por la tinción del multímero CMH codificado de doble color con 25 especificidades por muestra (eje Y).

45 Figura 9: muestra la correlación entre los diferentes enfoques de tinción de células T. La correlación entre las frecuencias de células T específicas de antígeno detectada por multímeros CMH codificados de dos colores con una especificidad de pCMH por muestra (eje X) y mediante la tinción del multímero CMH codificado de dos colores con 25 especificidades por muestra (eje Y).

50 Figura 10: muestra las respuestas de células T contra péptidos asociados a melanomas. El resumen de las respuestas de células T específicas de antígenos detectadas en pacientes con melanoma y donantes sanos, dirigidas contra: epítomos de células T derivados de virus restringidos por HLA-A3 (EBV_{RLR}, EBV_{RVR}, FLU_{ILR}), detección ex-vivo directa (▲); 22 péptidos restringidos de melanoma, detección directa ex vivo (■); o 22 péptidos restringidos de melanoma, después del enriquecimiento de células T y la expansión in vitro (*).

Figura 11: muestra la tinción intracelular de IFN γ que confirma la especificidad del péptido de poblaciones de células T multímero-reactivas con CMH definidas por codificación combinatoria. Los números de péptidos se refieren a las secuencias en la Tabla 2.

Ejemplos

Métodos

Generación de complejos péptido-CMH

5 Todos los péptidos se sintetizaron propiamente utilizando la química Fmoc estándar o fueron adquiridos de Pepscan (Pepscan Presto BV, Lelystad, Países Bajos). El bloque de construcción J UV-sensible se sintetizó como se describe (Toebe et al., 2006). Las cadenas pesada de HLA-A1, -A2, -A3 y -B7 recombinante y la cadena ligera humana β 2m se produjeron en *Escherichia coli*. La reacción de repliegamiento de CMH clase I se realizó como se describe (Garboczi et al., 1992) y los complejos de CMH clase I se purificaron por HPLC mediante filtración en gel en PBS (pH 7,4).

10 Se generaron complejos específicos de péptido-HLA por intercambio del péptido CMH. Los complejos de p*HLA (100 μ g/ml) fueron sometidos a luz UV de 366 nm (Camag) durante una hora en presencia del péptido indicado (200 μ M). Después del intercambio, las muestras se centrifugaron a 16.000 g durante 5 minutos, y los sobrenadantes se utilizaron para la formación del multímero de CMH.

Generación de multímeros de CMH

15 Los multímeros de CMH se generaron utilizando 8 diferentes conjugados de fluorescencia-estreptavidina (SA) (Invitrogen): SA-Qdot565, SA-Qdot585, SA-Qdot605, SA-Qdot655, SA-Qdot705, SA-Qdot800, SA-ficoeritrina (PE) y SA-alofocianina (APC). Por cada 100 μ L de monómero de CMH (conc. 100 μ g/ml) se añadieron 7,08 μ L de conjugado SA-Qdot (1 μ M), 10,8 μ L de SA-PE (1 mg/ml), o 6 μ L de SA-APC (mg/ml), seguido de la incubación en hielo durante 20 min. Suponiendo un rescate del 100% después del intercambio del péptido CMH, esto resultaría en una ocupación de 30 monómeros CMH por SA-Qdot. Se añadieron biotina (Sigma) y NaN_3 (Sigma) a una concentración final de 26,4 μ M y 0,02%, respectivamente, seguido de una incubación en hielo durante 20 min. Se diluyeron complejos marcados con PE y APC 2 veces en PBS con 0,02% de NaN_3 . Para cada complejo de pCMH, se hicieron multímeros con dos marcadores fluorescentes diferentes de acuerdo con los esquemas de la Tabla 1 y la Tabla 2.

25 Para tinciones de células T combinatorias, se mezclaron complejos multiméricos de la misma especificidad, 1:1 para complejos marcados con Q605, Q655, P705, PE y APC y 2:1 para complejos marcados con Q565, Q585 y Q800 en combinación con cualquier otro color. Se excluyeron las combinaciones de Q565, Q585 y Q800. Fueron generadas mezclas de pCMH combinadas para el análisis de las respuestas de células T por codificación combinatoria mediante la puesta en común y el almacenamiento a 4°C como solución madre lista para usar 50 veces concentradas para la tinción de las células T. Antes del uso, se centrifugaron los multímeros de CMH a 17.000 g durante 2 min y se utilizó el sobrenadante.

Tinción de células T

35 Para la tinción de células T de aprox. 1×10^6 PBMC o 2×10^5 células T cultivadas, se utilizaron 2 μ L de multímero simple de pCMH o 50 μ L de las colecciones de pCMH codificadas de dos colores (concentración final: 2 μ g/ml por pCMH distinto basado en la concentración inicial del monómero). El volumen de tinción final fue 80 μ L y se incubaron las células durante 10 min a 37°C. A continuación, se añadieron 20 μ L de una mezcla de anticuerpos de 5 veces que consistía en CD8-Alexa700 (Caltech CMHD0289) (dilución final 1/200), CD4-FITC (BD 345768) (dilución final de 1/8), CD14-FITC (BD 345784) (dilución final 1/32), CD19-FITC (BD345776) (dilución final 1/16), CD40-FITC (Serotech MCA1590F) (dilución final 1/40), CD16-FITC (BD 347523) (dilución final 1/64) y las células se incubaron durante 20-30 min a 4°C. Antes de la citometría de flujo, las células se lavaron dos veces y se añadió yoduro de propidio para permitir la exclusión de células muertas.

Citometría de flujo

45 La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo LSR II (Becton Dickinson) con el software FACSDiva usando los siguientes ajustes del instrumento de 11-colores: láser de 488 nm: PI: 685LP, 695/40; PE: 550LP, 575/26; FITC: 505LP, 530/30; SSC: 488/10. Láser de 633 nm: Alexa700: 685LP, 730/45; APC: 660/20. Láser de 405 nm: Qdot800: 770LP, 800/30; Qdot705: 680LP, 710/50; Qdot655: 635LP, 660/40; Qdot605: 595LP, 650/12. Láser de 355 nm: Qdot585: 575LP, 585/15; Qdot565: 545LP: 560/20.

50 Aproximadamente, se registraron 200.000 linfocitos por cada análisis. Para identificar las células T específicas de antígeno se utilizó la siguiente estrategia de clasificación: 1) Selección de los linfocitos de células individuales vivas (utilizando PI negativo, FSC-W/H baja, SSC-W/H baja, FSC/SSC-A). 2) Selección de células CD8 positivas y células negativas "reserva" (CD4, 14, 16, 19, 40). 3) Selección de CD8⁺ células T que son positivas en dos canales de multímero de CMH, y negativas en los otros seis canales de multímero de CMH.

Enriquecimiento de células T específicas de antígeno

Se tiñeron células T específicas de antígeno con multímeros PE (1,25 μ L de un lote a 100 μ g/mL de cada multímero PE individual para 10^7 CMSP) durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, se lavaron las células y se incubaron con 20 μ L de perlas magnéticas revestidas con anticuerpos anti-PE (Miltenyi). Las células fueron aisladas por MACS (Miltenyi), utilizando una columna LS y siguiendo el protocolo del fabricante. Las células eluidas se lavaron y se resuspendieron en 200 μ L de medio celular T (IMDM (Gibco) con suero humano al 10% (Invitrogen), 100 UI/ml de IL-2 (Proleukin) y 20 ng/ml de IL-15 (Peprotech) con 5000 Dynabeads anti-CD3/CD28 (Invitrogen). Se cultivaron células enriquecidas en placas de 96 pocillos y se volvieron a suspender al día siguiente. Los cultivos se dividen y se cambia el medio al menos dos veces a la semana. Después de 2-3 semanas, se midieron las respuestas de las células T específicas de antígeno mediante codificación combinatoria basada en citometría de flujo del multímero de CMH.

Clasificación y cultivos de células T

Se tiñeron células T con el multímero de pCMH relevante y luego se clasificaron en un MoFlo (Dako) o FACS Aria (Becton Dickinson) en 10^5 células alimentadoras irradiadas (JY, PBMC más alogénicas). Las células se centrifugaron y se resuspendieron en IMDM con suero humano al 10%, 100 UI/ml de IL-2 y 0,5 μ g/ml de PHA (Biochrom AG). Los cultivos se volvieron a estimular cada dos semanas. Se ensayaron cultivos establecidos para la especificidad del antígeno mediante la tinción del multímero de CMH.

Ensayo de liberación de citoquinas

Se cargaron células T2-A3 con los péptidos indicados durante 1 hora y se lavaron una vez. Se incubaron 1×10^5 células T a partir de los cultivos indicados con 1×10^5 de células T2-A3 durante 4 h a 37°C en IMDM con suero humano al 10% e inhibidor de transporte de proteína (BD GolgiPlug). Las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD8 conjugado con PE (SKL, BD) durante 15 min a 25°C, se fijaron y se permeabilizaron (Kit BD Cytfix/Cytoperm), y se tiñeron con anticuerpo anti-IFN γ conjugado con APC (25723.11, BD) durante 30 min a 4°C. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo (cian, Dako), el análisis de datos se realizó mediante FlowJo.

Ejemplo 1

Con el objetivo de desarrollar un esquema de codificación combinatoria que se base en el conjunto de códigos definidos en las células diana de interés, en primer lugar, se determinó la viabilidad de la utilización de un conjunto de 6 puntos cuánticos diferentes (Qdots, características enumeradas en la Figura 2) para la detección de las respuestas de las células T específicas de antígeno.

Los puntos cuánticos son nanocristales fluorescentes con una longitud de onda de emisión distinta en función de su diámetro y de la composición que presentan espectros de emisión muy estrechos (REF), haciéndolos muy adecuados para experimentos en los que se utilizan un gran número de fluorocromos simultáneamente.

Mediante el análisis de las respuestas de las células T CD8⁺ CMV-específicas de sangre periférica, se estableció que los complejos CMH que fueron multimerizados por acoplamiento a Qdots conjugados con estreptavidina o alofocianina estándar (APC) o ficoeritrina (PE) podían todos ser utilizados para detectar poblaciones de células T específicas de antígeno (datos no mostrados).

Posteriormente, se ensayó si las poblaciones de células T específicas de antígeno también podían ser identificadas de forma fiable mediante la unión de dos multímeros de CMH que contienen el mismo péptido antigénico, pero que están acoplados a un fluorocromo diferente. Las pruebas de los complejos de pCMH clase I conjugados con las 28 posibles combinaciones de dos fluorocromos diferentes demostraron que esta doble codificación puede en todos los casos identificar la población de células T apropiada.

La tinción simultánea de células T con dos multímeros de CMH marcados diferencialmente que contienen el mismo péptido antigénico conduce a una pequeña reducción en la intensidad de la fluorescencia para cada canal (un factor de 2 en equimolaridad), debido a la competencia por la unión al conjunto limitado de RCT disponibles en la superficie de las células T. Para limitar un efecto negativo de la competencia en la capacidad de visualizar poblaciones de células T específicas de antígenos, los tres qDots que dieron la señal de intensidad más baja en el sistema de citometría de flujo (Q565, Q585 y Q800) se utilizaron en una proporción de 2:1 en lugar de una proporción de 1:1 en relación con los otros fluorocromos, y las combinaciones Q565 + Q585, Q565 + Q800 y Q585 Q800 + -para las que un ajuste en la relación no es evidentemente práctica- no fueron utilizadas en experimentos posteriores.

El presente ejemplo muestra que los compuestos que presentan antígenos marcados de forma diferente cargados con el mismo antígeno son capaces de unirse a células sensibles a antígenos, de este modo, a través de la detección de estos diferentes marcadores, lo que permite la detección de estas células en una muestra.

Ejemplo 2

Pueden estar presentes poblaciones de células T específicas de antígeno a frecuencias muy bajas y los multímeros de CMH realmente muestran tinción de fondo en citometría de flujo. Para probar si la detección de las células T específicas de antígeno a través de la utilización de códigos combinatorios afecta a los niveles de fondo, o a la frecuencia de las células T específicas de antígeno detectada, se tiñeron PBMC que contenían células T específicas de HLA-A2 CMV_{NLV} o con multímeros de control o con multímeros HLA-A2 CMV_{NLV} y se analizaron mediante citometría de flujo.

En concreto, se incubaron PBMC ya sea con los 8 diferentes multímeros de CMH codificados de forma individual en 8 tinciones separadas, o con los 25 multímeros de CMH codificados duales en 25 tinciones separadas. Se consideraron las células T positivas cuando hubo tinción por encima del fondo, ya sea en un canal (en el caso de coloraciones de un solo color) o cuando la tinción fue positiva en ambos de los canales correspondientes (en el caso de tinciones de dos colores).

Como puede verse en la Figura 3, la frecuencia de células (falsos positivos) en las muestras de fondo es aproximadamente 10 veces menor cuando se utiliza un esquema de codificación doble en comparación con el enfoque de tinción tradicional simple, lo que muestra que la codificación de doble color de los multímeros de CMH es una herramienta poderosa para reducir las señales de fondo.

Ejemplo 3

Después de haber establecido la viabilidad de la codificación de color dual, se examinó a continuación si se podían realizar múltiples tinciones del multímero pCMH codificado de doble color en paralelo en una sola muestra. Para el análisis de las células T reactivas con cualquiera de los multímeros de pCMH codificados de color dual en una sola muestra, fue desarrollada primero una estrategia de clasificación (figura 4).

En resumen, fueron seleccionadas células vivas individuales en base a la dispersión frontal y lateral, la anchura/altura de la célula y la tinción con yoduro de propidio negativa. De este grupo, las células que se tiñeron positivamente para CD8 y negativamente para CD4, CD14, CD16, CD19 y CD40 (canal de "reserva", van Oijen et al., 2004) fueron identificadas después como células T CD8⁺ relevantes. Para las poblaciones de células T analizadas reactivas con cualquiera de los multímeros de pCMH codificados de doble color, se generaron puertas sobre la base de cada uno de los 8 fluorocromos individuales utilizados para la generación del multímero de CMH.

Esta estrategia, que identifica las células T que muestran una señal por encima del fondo en una combinación dada de dos canales y que son negativas en los 6 canales restantes, permite el análisis simultáneo de 25 combinaciones diferentes en un experimento de citometría de flujo, mientras que al mismo tiempo se reduce la tinción de la línea de fondo.

Ejemplo 4

Para probar el valor potencial de la técnica de codificación combinatoria en el análisis a gran escala de respuestas de células T, se generó un grupo de 25 multímeros CMH diferentes que contenían una gama de epítomos virales y asociados al cáncer conocidos para los alelos de CMH humanos HLA-A1, -A2, -A3 y -B7 (Tabla 1) mediante el intercambio de péptidos CMH (Toebe et al, 2006; Rodenko et al, 2006; Bakker et al., 2008). Cada uno de estos multímeros de pCMH se acopló posteriormente a dos fluorocromos que generaban el conjunto de los códigos únicos descritos en la Tabla 1.

Para poder comparar los datos obtenidos mediante la codificación combinatoria con el análisis de multímeros de CMH convencional, el conjunto de 25 multímeros de pCMH diferentes también se acopló a PE. Además, con el fin de determinar la línea de fondo de la codificación combinatoria, se preparó también una serie de multímeros de pCMH irrelevantes en todas las combinaciones de dos colores. Posteriormente, las PBMC de 3 donantes sanos que cubrían los 4 alelos de HLA se analizaron entonces mediante 1) una única tinción con la colección del epítomo viral codificado de color dual y de cáncer que contenían multímeros de pCMH, 2) Una tinción individual con una mezcla de multímeros de pCMH irrelevantes codificados de doble color, 3) 25 tinciones separadas con los 25 multímeros de pCMH marcados con PE, o 4) 25 tinciones separadas con todos los multímeros de pCMH codificados de doble color individuales.

La comparación de '1' y '4' es de particular interés ya que revela si la presencia simultánea de un gran número de multímeros de pCMH no relacionados que están marcados con los mismos fluorocromos, o la presencia de altas concentraciones de pCMH, influye en las señales de la línea de fondo.

El experimento se realizó de una manera ciega, tanto con respecto al haplotipo HLA de los donantes como con respecto a un análisis previo de las respuestas de células T específicas de antígeno en estos donantes. El análisis de las respuestas de las células T específicas de enfermedad/patógenos en los 3 donantes con estos enfoques reveló que la codificación combinatoria de multímeros de pCMH permite la visualización de un número de poblaciones de células T específicas de antígeno en una sola muestra (Figuras 5-7).

Es importante destacar que las mismas poblaciones de células T específicas de virus se encontraron en cada donante cuando se analizaba mediante una gran serie de tinciones de PE-multímeros individuales. Además, una comparación directa de las tinciones separadas de los multímeros de CMH PE-acoplados con la tinción múltiple utilizando la colección de 25 multímeros de CMH codificados duales revela una correlación muy alta entre los dos enfoques para la visualización de poblaciones de células T específicas de antígeno, ambas para el examen de poblaciones de células T de alta frecuencia y de baja frecuencia (Figura 8).

Además, la comparación de los datos obtenidos en el análisis de PBMC teñidas con la colección de multímeros de pCMH codificados de doble color en una muestra en comparación con el mismo conjunto de multímeros de pCMH codificados de dos colores utilizado en 25 tinciones separadas también revela una correlación muy alta (Figura 9).

Este último hallazgo indica que la medición simultánea de múltiples especificidades de antígeno mediante la incubación con conjuntos de multímeros de CMH en la que cada multímero de pCMH está acoplado a una combinación diferente de fluorocromos es factible, a pesar de que el mismo fluorocromo esté acoplado a un gran número de complejos de CMH que contienen diferentes péptidos.

Por lo tanto, se demuestra que no es un problema la potencial reactividad cruzada de las células T con cualquiera de los muchos complejos de pCMH irrelevantes en la mezcla de tinción. Además, estas observaciones indican que el uso de una mezcla que contiene una alta concentración de moléculas de CMH multiméricas no interfiere con la tinción del multímero de CMH. Por último, la comparación de las señales observadas cuando se utiliza el conjunto de pCMH codificado de color dual ocupado con epítomos asociados a enfermedad/patógenos con la señal observada cuando se usa la colección de 25 multímeros de CMH irrelevantes indica que la sensibilidad del método es alta, y pueden ser identificadas poblaciones de células T tan infrecuentes como el 0,03% de las células CD8 positivas (Figuras 5-7).

Ejemplo 5

Como los experimentos anteriores demostraron que el enfoque de codificación combinatoria previsto puede ser utilizado para visualizar una multitud de poblaciones de células T en una sola muestra, se evaluó su valor potencial en la identificación de epítomos.

En una reciente detección establecida para identificar los potenciales epítomos de melanoma asociados a HLA-A3, 22 péptidos fueron identificados a partir de 4 diferentes proteínas asociadas a melanoma que mostraban una alta afinidad de unión para HLA-A3. Este conjunto incluye los 4 epítomos asociados a HLA-A3 anteriormente descritos, así como 18 nuevos epítomos potenciales.

Para hacer frente a la viabilidad de la detección de pequeñas muestras de pacientes para las respuestas contra el conjunto de epítomos (potenciales), se generaron reactivos de CMH por intercambio de péptido para los 22 epítomos, así como para 3 epítomos de EBV HLA-A3-asociados y derivados de influenza A. Para ser capaz de revelar también las respuestas de las células T de bajo nivel, se realizó un solo paso de enriquecimiento por MACS con 22 multímeros de pCMH que contenían los posibles epítomos asociados a tumores, seguido de una expansión in vitro a corto plazo de las células enriquecidas.

Las 25 multímeros de pCMH diferentes se acoplan a continuación a dos fluorocromos en un esquema de codificación combinatoria bidimensional y se utilizan para seleccionar las PBMC enriquecidas de 27 pacientes de melanoma HLA-A3 positivos.

Usando este método de tinción en paralelo de multímeros de CMH, pudo ser confirmada la presencia de respuestas de células T dirigidas contra los 3 epítomos anteriormente descritos gp100-asociados. Además, se observaron respuestas de células T CD8⁺ contra un epítomo previamente desconocido derivado de gp100 humano (QLRALDGGNK), frente a 2 epítomos previamente desconocidos derivados de Nodal (SLYRDPLPR y HAYIQSLLK), y frente a 1 epítomo previamente desconocido derivado de TYRP2 (RMYNMVPFF) (Tabla 2).

Es importante destacar que cuando se analizaron PBMC a partir de 10 donantes de HLA-A3⁺ sanos de la misma manera, no se observaron respuestas en ninguno de los donantes, mientras que las respuestas de las células T contra epítomos virales eran igualmente abundantes en ambos grupos (Figura 10).

Con el fin de determinar si las poblaciones de células T observadas muestran actividad funcional contra células diana que muestran los correspondientes péptidos, se clasificaron células T específicas de antígeno a partir de PBMC a partir de diferentes pacientes y se expandieron in vitro. Las poblaciones de células T resultantes se ensayaron a continuación para determinar la especificidad de antígeno con un ensayo de citoquina intracelular después de la incubación con las células diana cargadas de péptido (Figura 11).

Todos los cultivos muestran la producción de IFN γ cuando se incubaron con su antígeno afín (Figura 11). No se observó ninguna respuesta cuando los cultivos de células T se incubaron con células que no se cargaban con el péptido.

Estos resultados muestran que una lista previamente descrita de péptidos que tienen una alta afinidad de unión para HLA-A3 contiene al menos 8 epítomos asociados a melanoma contra los que las respuestas de las células T se pueden observar en los pacientes con melanoma de los cuales 5 no se habían descrito previamente. Además, las detecciones que se realizaron en el material del paciente disponible no habían sido posibles sin la posibilidad del análisis múltiple ofrecido por la codificación multicolor de especificidades de antígeno de acuerdo con la presente invención.

Conclusión

La técnica de codificación combinatoria de acuerdo con la presente invención se demuestra que es una herramienta valiosa para la detección y el análisis de múltiples respuestas inmunes de forma simultánea.

- 10 Fue desarrollada una estrategia de codificación combinatoria que permitía la detección en paralelo de una multitud de diferentes poblaciones de células T dentro de una sola muestra. La detección de células T específicas de antígeno a partir de sangre periférica mediante la codificación combinatoria es tan eficiente como la detección con multímeros convencionales marcados con PE, pero da como resultado un aumento significativo de la sensibilidad, y lo más importante, permite que se realicen detecciones completas en el material del paciente.
- 15 La viabilidad de la detección a gran escala de materiales de pacientes se demostró mediante el análisis de las respuestas de células T contra antígenos asociados con melanomas conocidos y potenciales en la sangre periférica de pacientes con melanoma. Estas detecciones confirmaron la existencia de respuestas de células T contra conocidos epítomos de células T y condujeron a la identificación de una serie de nuevas respuestas de células T asociadas a melanoma en el contexto de HLA-A3.
- 20 Se concluye que la codificación combinatoria de conjugados de péptido-CMH permite el análisis de alto rendimiento de la inmunidad de células T específicas de antígeno en una sola muestra.

Tabla 1: Lista de los 25 epítomos de células T derivadas de virus y cánceres. Para cada epítomo, los multímeros de CMH fueron codificados por la combinación de fluorocromo indicada.

ES 2 568 786 T3

No.	Péptido	Codificación
1	A2 HPV E6	PE & APC
2	A3 CMV pp150 TTV	PE & Q565
3	A2 FLU GIL	PE & Q585
4	A2 gp100 2M	PE & Q605
5	A2 EBV LMP2 CLG	PE & Q655
6	A2 EBV BMF1 GLC	PE & Q705
7	A2 <i>Tirosinasa</i>	PE & Q800
8	A2 <i>Surlm2</i>	APC & Q565
9	A1 CMV pp65 YSE	APC & Q585
10	A2 EBV LMP2 FLY	APC & Q605
11	A3 FLU NP ILR	APC & Q655
12	A2 HA-2	APC & Q705
13	A2 CMV pp65 NLV	APC & Q800
		Q565 & Q585
14	B7 CMV pp65 TPR	Q565 & Q605
15	A1 CMV pp50 VTE	Q565 & Q655
16	A2 EBV BRLF1 YVL	Q565 & Q705
		Q565 & Q800
17	A2 HPV E7	Q585 & Q605
18	A3 EBV EBNA 3a RLR	Q585 & Q655
19	A1 FLU BP-VSD	Q585 & Q705
		Q585 & Q800
20	B7 CMV pp65 RPH-L	Q605 & Q655

21	B7 EBV EBNA RPP	Q605 & Q705
22	A2 HY	Q605 & Q800
23	A3 CMV pp150 TVY	Q655 & Q705
24	A2 CMV IE1 VLE	Q655 & Q800
25	A3 EBV BRLF1 RVR	Q705 & Q800

Tabla 2: Lista de los 22 ligandos de HLA-A3 asociados a melanoma y tres epítomos restringidos de HLA-A3 derivados de virus. Para cada péptido, los multímeros de CMH fueron codificados por la combinación del fluorocromo indicada.

No	Proteína	Péptido	Posición	Codificación
1	Gp100	IALNFPQSQK	86-95	PE & APC
2		LIYRRRLMK	614-622	PE & Q565
3		GTATLRLVK	460-468	PE & Q585
4		ALLAVGATK	17-25	PE & Q605
5		ALNFPQSQK	87-95	PE & Q655
6		GVSRQLRTK	34-42	PE & Q705
7		QLVLHQILK	551-559	PE & Q800
8		QLRALDGGNK	221-230	APC & Q565
9	Nodal	SLYRDPLPR	46-54	APC & Q585
10		HAYIQSLLK	293-301	APC & Q605
11		KTKPLSMLY	317-325	APC & Q655
12		RVAGECWPR	175-183	APC & Q705
13	Tyr	YMVPFIPLYR	425-434	APC & Q800
14		SLLCRHKRK	497-505	Q565 & Q605
15		VSSKNLMEK	25-33	Q565 & Q655
16		GLVSLLCRHK	494-503	Q565 & Q705
17	Tyrp1	SLPYWNFATR	245-254	Q585 & Q605
18		ASYLIRARR	497-505	Q585 & Q655
19	Tyrp2	TLLGGRPYR	196-205	Q585 & Q705
20		GTYEGLLR	301-309	Q605 & Q655
21		RMYNMVPPF	461-469	Q605 & Q705
22		VLLAFLQYR	521-529	Q605 & Q800
23	Influenza NP	ILRGSVAHK	265-273	Q655 & Q705
24	EBV EBNA 3a	RLRAEAQVK	603-611	Q655 & Q800
25	EBV BRLF1	RVRAYTYSK	148-156	Q705 & Q800

5

Referencias

Arstila TP, Casrouge A, Baron V, Even J, Kanellopoulos J, Kourilsky P. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. Science 1999; 286(5441):958-61.

10 Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. Science 1996; 274(5284):94-6.

Chattopadhyay PK, Price DA, Harper TF, Betts MR, Yu J, Gostick E, et al. Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry. Nat Med 2006; 12(8): 972-7.

- Soen Y, Chen DS, Kraft DL, Davis MM, Brown PO. Detection and characterization of cellular immune responses using peptide-MHC microarrays. *PLoS Biol* 2003; 1(3):E65.
- Stone JD, Demkowicz WE, Jr., Stern LJ. HLA-restricted epitope identification and detection of functional T cell responses by using MHC-peptide and costimulatory microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(10):3744-9.
- 5 Xu H, Sha MY, Wong EY, Uphoff J, Xu Y, Treadway JA, et al. Multiplexed SNP genotyping using the Qbead system: a quantum dot-encoded microsphere-based assay. *Nucleic Acids Res* 2003; 31 (8):e43.
- Haanen JB, Wolkers MC, Kruisbeek AM, Schumacher TN. Selective expansion of cross-reactive CD8(+) memory T cells by viral variants. *J Exp Med* 1999; 190(9):1319-28.
- 10 van Oijen M, Bins A, Elias S, Sein J, Weder P, de Gast G, et al. On the role of melanoma-specific CD8+ T-cell immunity in disease progression of advanced-stage melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (14):4754-60.
- Toebe M, Coccors M, Bins A, Rodenko B, Gomez R, Nieuwkoop NJ, et al. Design and use of conditional MHC class I ligands. *Nat Med* 2006; 12(2):246-51.
- Rodenko B, Toebe M, Hadrup SR, van Esch WJ, Molenaar AM, Schumacher TN, et al. Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. *Nat Protoc* 2006; 1(3): 1120-32.
- 15 Bakker AH, Hoppes R, Linnemann C, Toebe M, Rodenko B, Berkers CR, et al. Conditional MHC class I ligands and peptide exchange technology for the human MHC gene products HLA-A1, -A3, -A11, and -B7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(10): 3825-30.
- Garboczi DN, Hung DT, Wiley DC. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(8):3429-33.
- 20

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de células sensibles a antígenos en una muestra que comprende:
- proporcionar complejos mayores de incompatibilidad (CMH), que llevan al menos un marcador, con tres o más antígenos predeterminados, preferiblemente péptidos, en el que cada antígeno se representa por al menos dos marcadores diferentes;
 - poner en contacto dichos complejos mayores de incompatibilidad (CMH) con dicha muestra;
 - detectar la unión de dichos complejos mayores de incompatibilidad (CMH) cargados con antígeno a dichas células sensibles a antígeno, detectando así las células sensibles a dicho antígeno;
- en el que dichas células sensibles a antígeno son células T y en donde dicho antígeno se detecta mediante la detección de la presencia de dichos al menos dos marcadores diferentes unidos a una célula sensible a antígeno a través de dichos complejos mayores de incompatibilidad (CMH) cargados con dicho antígeno.
2. El método según la reivindicación 1, en el que dichos complejos mayores de incompatibilidad (CMH) se proporcionan con un marcador y dicho antígeno se representa, o se codifica, por al menos dos diferentemente marcados complejos mayores de histocompatibilidad (CMH).
3. El método según la reivindicación 1, en el que dichos complejos mayores de incompatibilidad (CMH) se proporcionan con al menos dos marcadores diferentes y dicho antígeno se representa, o se codifica, por un complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) marcado.
4. El método según la reivindicación 1, en el que dichos complejos mayores de incompatibilidad (CMH) son complejos mayores de incompatibilidad (CMH) multiméricos, preferiblemente compuestos por al menos cuatro monómeros.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichos marcadores son marcadores fluorescentes, preferiblemente dichos marcadores fluorescentes comprenden qDots.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el número de diferentes marcadores se selecciona del grupo que consiste en tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, y ocho o más.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho antígeno está representado por al menos tres o al menos cuatro marcadores diferentes.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha muestra es una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha detección comprende citometría de flujo.

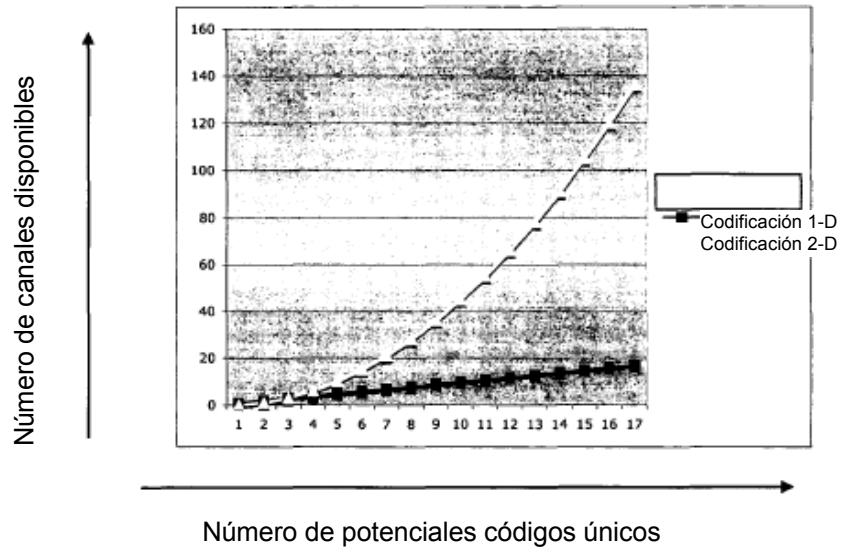


Figura 1

	PE	APC	QD565	QD585	QD605	QD655	QD705	QD800
PE	x	x	x	x	x	x	x	x
APC		x	x	x	x	x	x	x
QD565			x	x	x	x	x	x
QD585				x	x	x	x	x
QD605					x	x	x	x
QD655						x	x	x
QD705							x	x
QD800								x

Figura 2

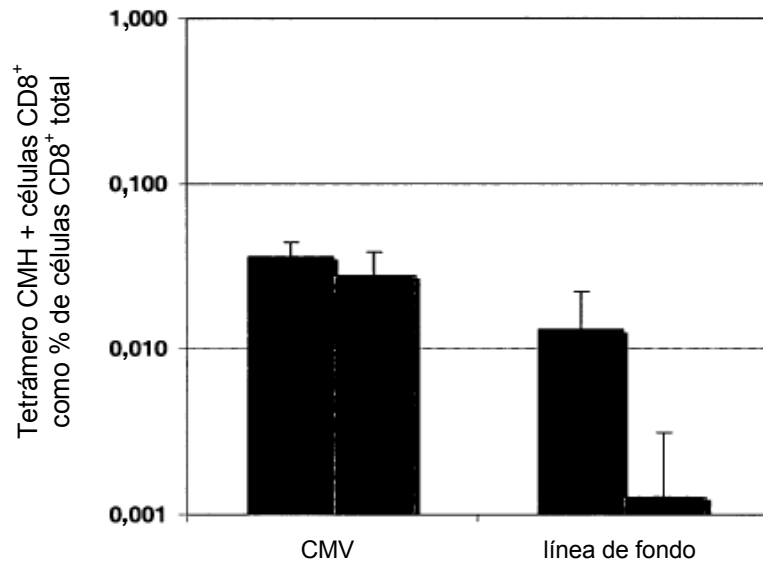


Figura 3

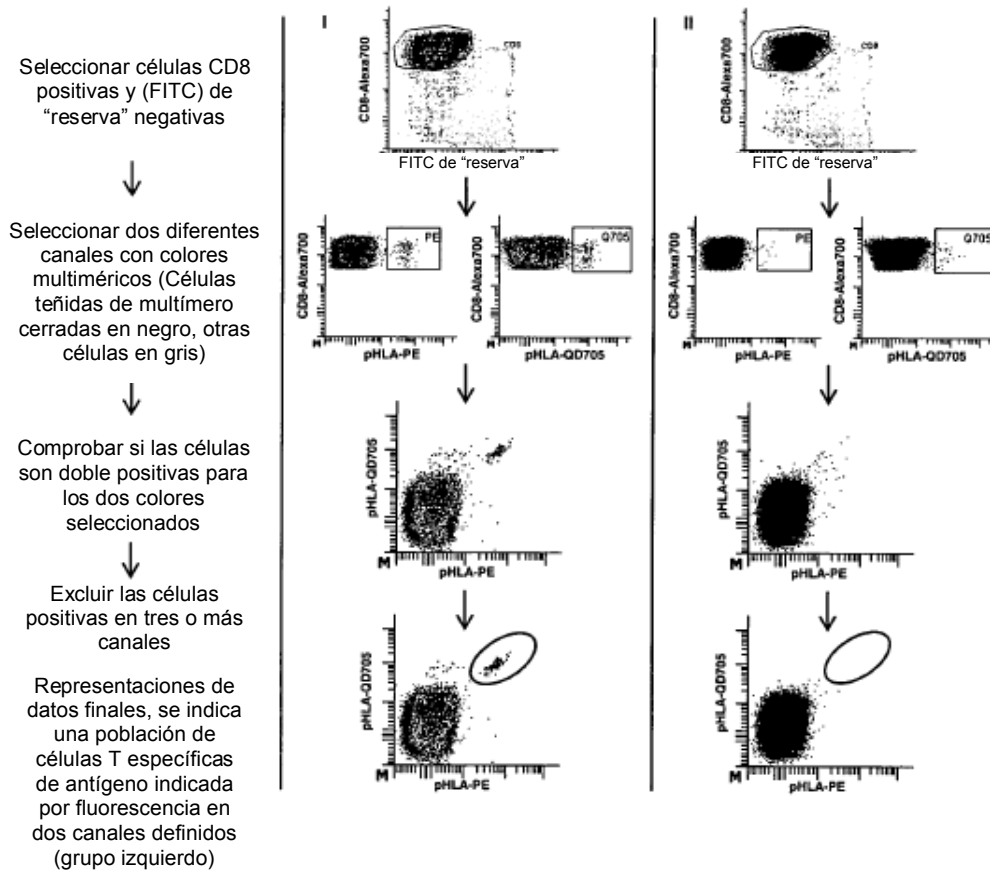


Figura 4

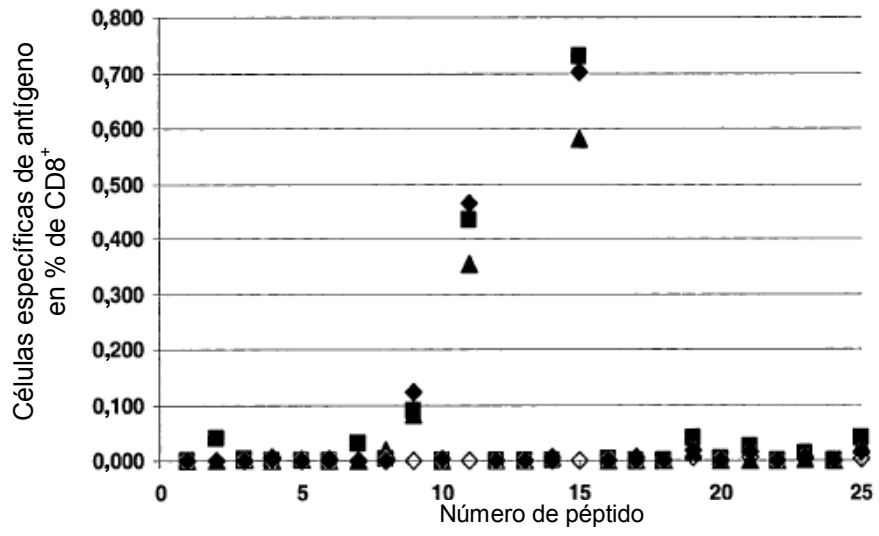


Figura 5

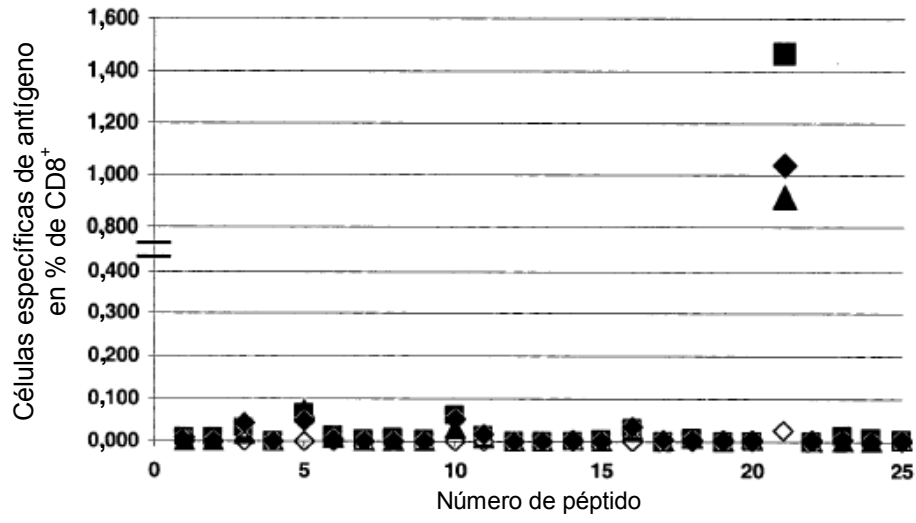


Figura 6

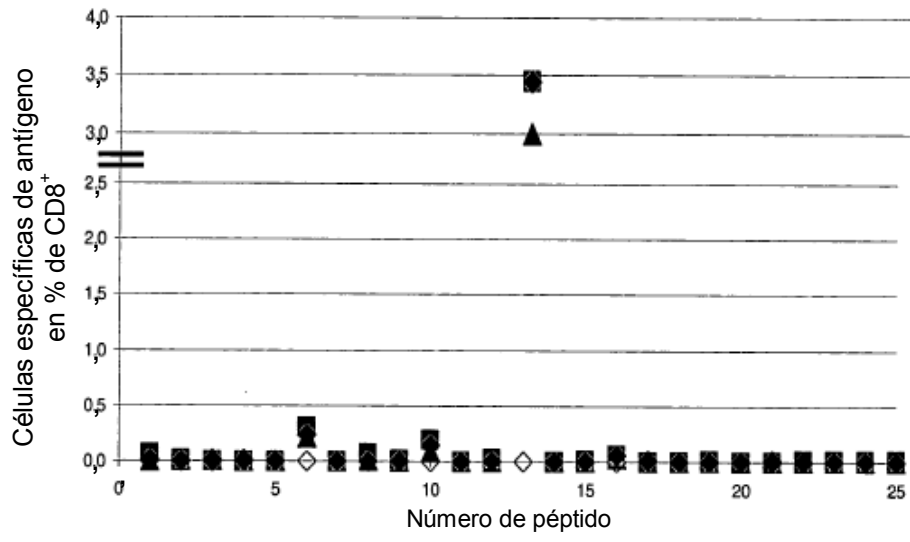


Figura 7

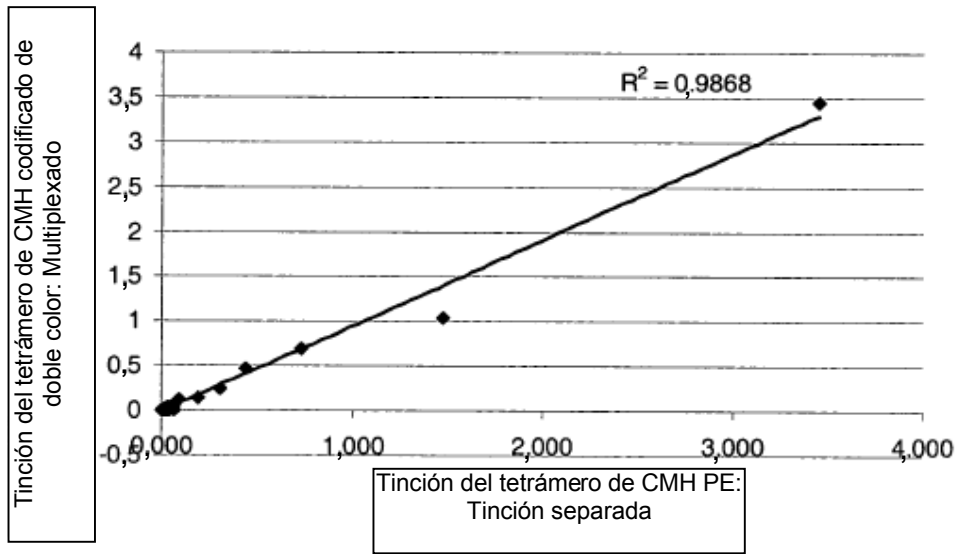


Figura 8

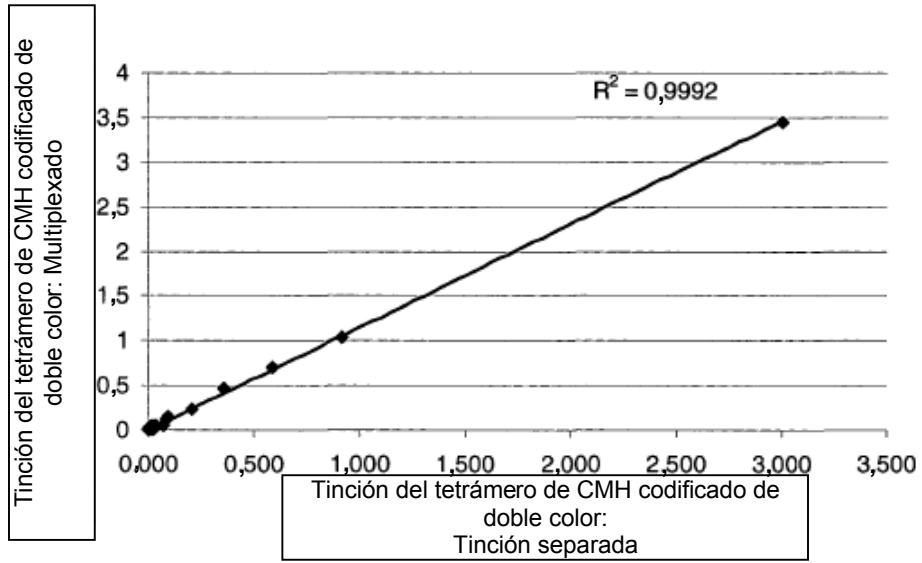


Figura 9

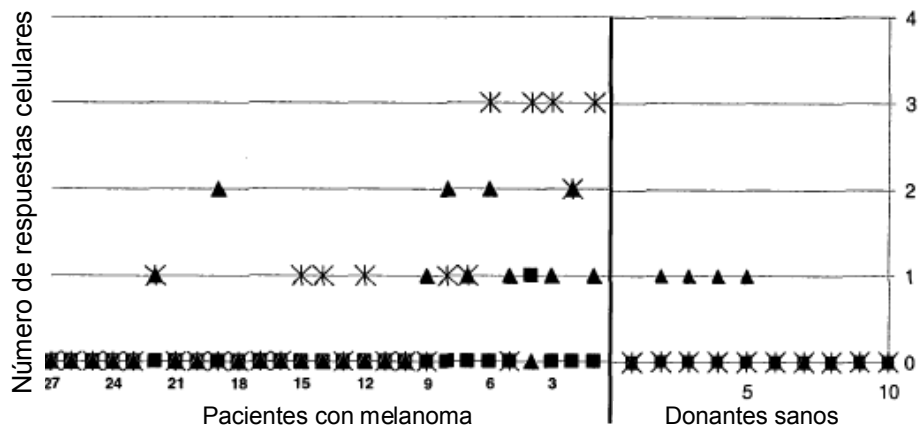


Figura 10

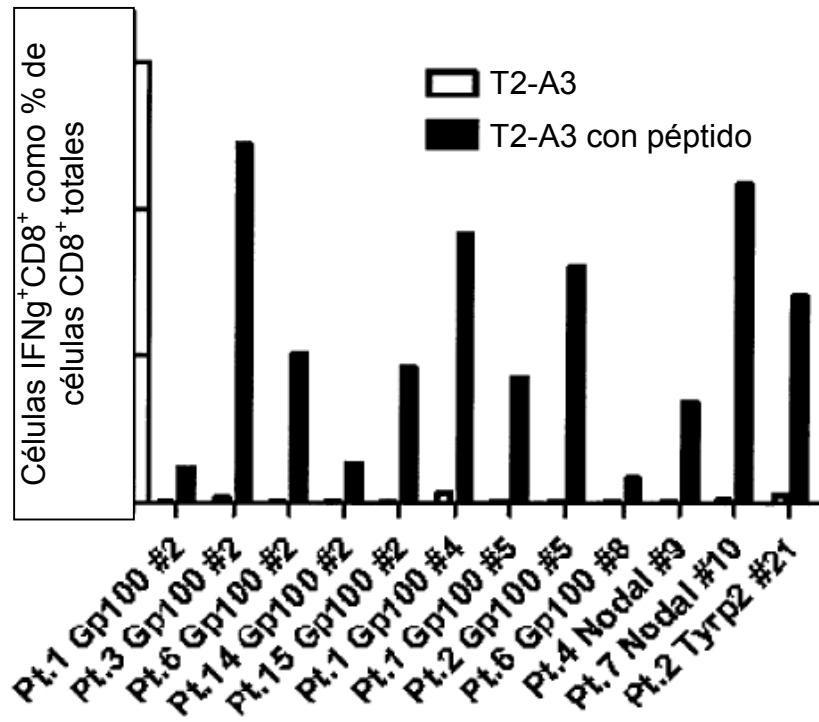


Figura 11