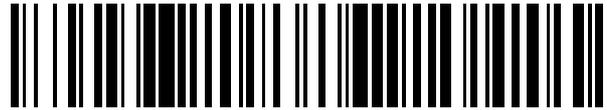


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 388**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2011 E 11730044 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2536746**

54 Título: **Heterodímeros del MHC de clase II solubles funcionales estabilizados por enlaces disulfuro**

30 Prioridad:

18.02.2010 US 305728 P
18.02.2010 GB 201002730
23.03.2010 US 316576 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.05.2016

73 Titular/es:

UNIVERSITETET I OSLO (100.0%)
Boks 1072 Blindern
0316 Oslo, NO

72 Inventor/es:

LØSET, GEIR ÅGE;
FRIGSTAD, TERJE;
SANDLIE, INGER y
BOGEN, BJARNE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 572 388 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

Heterodímeros del MHC de clase II solubles funcionales estabilizados por enlaces disulfuro

5 La presente invención se refiere a moléculas de MHC de clase II recombinantes estabilizadas por enlaces disulfuro.

10 La molécula de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es un componente central del sistema inmunitario de vertebrados hallado en la superficie de todas las células nucleadas. El MHC se encuentra en dos formas principales, concretamente como MHC de clase I y clase II. Resulta importante que ambas versiones forman complejos funcionales con péptidos procesados proteolíticamente, denominados epítomos de linfocitos T, lo que tiene lugar dentro de la misma célula que expresa el MHC dado. El complejo de péptido/MHC (pMHC) resultante se encuentra posteriormente como un complejo transmembrana en la superficie de la célula, un fenómeno descrito como presentación de antígenos. El pMCH unido a superficie celular puede después interactuar con su compañero afín, el receptor de linfocitos T (TCR), que se encuentra en la superficie de linfocitos T.

15 Dado su papel clave en la inmunidad adaptativa, la ciencia básica y aplicada tienen un interés sustancial en el entendimiento de la interacción de pMHC-TCR tanto en el nivel celular como en el molecular y por lo tanto tener acceso a versiones recombinante des ambas moléculas. También se entiende cada vez más que la disponibilidad de dichas moléculas recombinantes es absolutamente crítica para poder estudiar y entender la biología del sistema, así como para desarrollar nuevos productos terapéuticos y de diagnóstico.

20 Muchas afecciones médicas significativas requieren intervenciones terapéuticas para modular la actividad del sistema inmunitario del paciente. Por ejemplo, en enfermedades y alergias, el sistema inmunitario hiperactivo y la inflamación crónica tienen que suprimirse. Por el contrario, la inmunoestimulación es un enfoque relevante para infecciones y cánceres para activar y dirigir las células inmunitarias hacia las células cancerosas. Además, los receptores de trasplante habitualmente requieren inmunosupresión. En su conjunto esto ha conducido al desarrollo de una amplia cantidad de inmunomoduladores, en la actualidad una industria de varios miles de millones de dólares.

25 Una clave para el entendimiento del componente inmunitario en estas enfermedades, y exploración con respecto a nuevos tratamientos, es la interacción entre las células presentadoras de antígenos y los linfocitos T, o más específicamente, la interacción entre moléculas de MHC de clase I y II y el TCR. El MHC de clase II se une específicamente con péptidos derivados de forma exógena, y los presenta a linfocitos T auxiliares CD4+ (linfocitos TH). El linfocito TH se activa después y se convierte en una célula efectora que secreta diversas citocinas. Estas citocinas activan una amplia serie de células inmunitarias adicionales implicadas en el tratamiento de la amenaza. Un fallo en este sistema puede conducir a, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria o a permitir que las células cancerosas sobrevivan y se dividan. Por lo tanto, las enfermedades autoinmunitarias se caracterizan por una fuerte asociación con MHC e infiltración de linfocitos T en el órgano diana.

30 Una plataforma para exploración de inmunomoduladores requiere moléculas de MHC solubles, completamente funcionales, estables. Es importante que la producción de moléculas de MHC de clase II solubles está actualmente obstaculizada por un grave problema, concretamente la falta de estabilidad molecular.

35 En los últimos años la capacidad de producir moléculas de MHC de clase I solubles como tetrameros (tecnología tetramérica) ha revolucionado la inmunología básica y aplicada (Constantin *et al.*, 2002, Biological Research for Nursing, 4: 115-127). La razón para esto es que la tecnología tetramérica ha aumentado sustancialmente la capacidad de seguir la evolución de una respuesta inmunitaria de una manera específica tanto con respecto al antígeno como con respecto a la respuesta de linfocitos T, evaluada principalmente por citometría de flujo. Esta capacidad también se ha traducido a un entendimiento mucho más profundo del sistema inmunitario y puede de hecho dar lugar a nuevas herramientas de diagnóstico.

40 Hasta la fecha, los reactivos tetraméricos se han limitado en gran medida a las moléculas de MHC de clase I, ya que parece que se han resuelto la mayoría de los problemas técnicos con respecto a la producción de MHC de clase I recombinante. De hecho, con respecto a las moléculas de MHC de clase II, esta tarea ha demostrado ser significativamente más difícil. Por lo tanto, no está disponible en la actualidad ningún protocolo general para la producción de tetrameros de MHC de clase II, aunque aparecen ejemplos individuales tanto en la bibliografía como como reactivos disponibles en el mercado (Vollers, S. y Stern, L., 2008, Immunology 123: 305-313). En los pocos casos en los que han estado disponibles tetrameros de MHC de clase II, se han usado extensivamente, y tienen un enorme impacto en el entendimiento del desarrollo de enfermedades. Por lo tanto, dado el impacto que la producción de MHC de clase I recombinante exitosa ha mostrado ya, puede verse que hay una motivación fuerte y clara, tanto académica como comercial, para esforzarse más en las vías de producción de MHC de clase II nuevas. Sin embargo, dados los problemas encontrados hasta la fecha, el éxito es incierto.

45 Debido a razones parcialmente desconocidas, la molécula de MHC de clase II ha resultado ser especialmente difícil de producir como una molécula recombinante estable en forma soluble. La molécula nativa es un heterodímero transmembrana no covalente que comprende una cadena α y una β , ambas de las cuales tienen regiones

transmembrana y pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulina (Ig). La parte extracelular de cada cadena está compuesta de dos dominios, que consisten cada uno en aproximadamente 90 restos de aminoácidos, de los que los dos dominios distales de membrana, los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$, forman una estructura α/β reticulada esencial para la propiedad de unión a péptidos de los epítomos de linfocitos T. Los dos dominios proximales de membrana, los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$, forman ambos dominios de Ig discretos. Tanto en la cadena α como en la β , se localiza un tramo de aproximadamente 20 restos de aminoácidos que atraviesan la membrana celular y en el lado citoplasmático de la membrana un segmento peptídico bastante corto.

Se cree que la dimerización de la cadena α y β está provocada por (i) los segmentos transmembrana, (ii) unión a péptidos y (iii) componentes adyuvantes potenciales hallados en la membrana. Por lo tanto, una vez separada de su contexto nativo y producida como una molécula soluble, la molécula de MHC de clase II padece con frecuencia estabilidad intrínsecamente baja y niveles de producción muy bajos. Además, debe llevarse a cabo optimización dependiente del caso que requiera recursos y extensiva.

Además, dados los requisitos anteriores para dimerización, se cree que los métodos generales de producción de moléculas de MHC de clase II en cualquier contexto no nativo, es decir, cualquier contexto distinto de la producción en asociación con una membrana de una célula expresando dicha célula de forma natural moléculas de MHC de clase II, por ejemplo, producción como moléculas no solubles presentadas en la superficie de otras entidades biológicas, células o partículas, por ejemplo como moléculas no solubles expresadas en la superficie de un fago por medio de fusión con proteínas de la cápsida viral, están lejos de ser fáciles.

Por lo tanto, en la actualidad no hay ninguna estrategia general que exista que permita la producción de un heterodímero de MHC de clase II estabilizado. Sin embargo, se ha llevado a cabo una diversidad de estudios que representan todos ejemplos exitosos específicos de caso que reflejan la complejidad de la tarea. Estos ejemplos son (i) la expresión ectópica de un heterodímero de MHC de clase II unido a membrana en la superficie de células eucariotas mediante el uso de una unión lipídica (anclaje GPI), véase Wettstein *et al.*, 1991, *J. of Exp. Medicine*, 174: 219-228; (ii) la expresión de ectodominios de MHC de clase II en células de insectos, véase Walny *et al.*, 1995, *Eur. J. Immunology*, 25: 1262-1266; (iii) la introducción de motivos de dimerización heterólogos, tales como la cremallera de leucina, de forma C terminal en las moléculas de MHC de clase II, en combinación con producción de células de insectos, véase Quarsten *et al.*, 2001, *J. Immunol.*, 167: 4861-4868, y Crawford *et al.*, 2006, *Immunological Reviews*, 210: 156-170; (iv) la producción de quimeras de anticuerpo/MHC de clase II en combinación con producción de células de insectos, véase Casares *et al.*, 1997, *Protein Engineering*, 10: 1295-1301; (v) el uso de sistemas de expresión bacterianos que permite la formación de trímeros de pMHC funcionales mediante enfoques de replegamiento de cuerpos de inclusión, véase Arimilli *et al.*, 1995, *J. Biol. Chem.*, 270: 971-977; o (vi) el uso de un formato de MHC de clase II monocatenario producido por bacterias truncado que está comprendido por los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ solamente, que permite la formación de moléculas de MHC funcionales mediante enfoques de replegamiento de cuerpos de inclusión, véase Burrows *et al.*, 1999, *Protein Engineering*, 12: 771-778. Además, Landais *et al.*, 2009, *J. Immunol.*, 183: 7949-7957, describe un sistema de expresión de células de insectos que usa enlaces disulfuro artificiales internos junto con cremalleras de leucina exógenas para producir tetrámeros de MHC de clase II OVA I-A^d murino estabilizado. Resulta importante que, y a pesar de los niveles de expresión aumentados debido a la modificación, ninguna de estas moléculas con estabilidad aparentemente aumentada mostró tinción de linfocitos T específica.

Los documentos WO 2006/102170 y US 2008/0064859 se refieren ambos a moléculas de MHC recombinantes útiles para la manipulación de linfocitos T específicos de antígeno. El documento WO 98/06749 se refiere a proteínas de fusión de MHC de clase II monovalentes y multivalentes solubles, y usos de las mismas.

Las estrategias descritas en el presente documento proporcionan ventajas significativas sobre dichos sistemas de la técnica anterior ya que no solamente proporcionan una estrategia general que puede aplicarse a todas las moléculas de MHC de clase II sino que también pueden implementarse en un sistema de expresión procariota y no requieren el uso de motivos de dimerización heterólogos/exógenos tales como cremalleras de leucina. Además, las estrategias descritas en el presente documento se traducen en un aumento de la funcionalidad visto como tinción de linfocitos T específicos, atribuido directamente a las modificaciones introducidas.

Sorprendentemente sin embargo, los presentes inventores han identificado un método general por lo que los problemas de inestabilidad asociados con moléculas de MHC de clase II recombinantes pueden superarse, o en gran medida aliviarse. Esta estrategia implica la producción de moléculas de MHC de clase II recombinantes en las que están presentes partes extracelulares de la cadena α y la P y el heterodímero de cadena α y β se estabiliza por un enlace disulfuro artificial/modificado técnicamente que une las dos cadenas usando el interfaz del dominio $\alpha 2$ - $\beta 2$. El enlace disulfuro bloquea la molécula en una conformación estable, en la que es completamente funcional. Resulta importante, y ventajoso, que esta estrategia para estabilizar el heterodímero de MHC de clase II es versátil y no se limita a un único formato recombinante, evitando de este modo la necesidad de optimización dependiente del caso que requiere recursos y extensiva analizada anteriormente. Además, a diferencia de varios de los métodos existentes, esta estrategia puede implementarse en un sistema de expresión/hospedador procariota lo que en sí mismo es sorprendente, dado que el hecho de que los hospedadores procariotas carecen de la maquinaria compleja

de una célula eucariota, que se requiere en general para formación de enlaces disulfuro correctos y por lo tanto la formación de moléculas funcionales. La presente invención no solamente resuelve un problema actual que dificulta el campo de la exploración y el desarrollo de inmunomoduladores, sino que también es una herramienta importante para el desarrollo y modificación de linfocitos T y el uso de estos como terapia.

5 Las realizaciones de la presente invención se definen en las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a una molécula de MHC de clase II recombinante, que comprende:

- 10 (i) toda o parte de la parte extracelular de una cadena α de MHC de clase II;
 (ii) toda o parte de la parte extracelular de una cadena β de MHC de clase II;

en la que (i) y (ii) proporcionan un dominio de unión a péptido funcional y en la que (i) y (ii) están unidos por un enlace disulfuro entre restos de cisteína localizados en el dominio α_2 de dicha cadena α y el dominio β_2 de dicha cadena P, en la que dichos restos de cisteína no están presentes en dominios α_2 y β_2 de MHC de clase II nativos, y en la que dicha molécula recombinante no comprende un motivo de cremallera de leucina. Preferentemente dicho enlace disulfuro se localiza entre restos de cisteína situados en Pro 96 ^{α_2} - Ser 119 ^{β_2} (rango 1), Ser 95 ^{α_2} - Ser 121 ^{β_2} (rango 2) o Arg 94 ^{α_2} - Asn 151 ^{β_2} (rango 3) de un isotipo I-E murino o las localizaciones equivalentes en un isotipo de MHC de clase II alternativo. Preferentemente uno o más de los restos de cisteína correspondientes a las posiciones 38, 42 o 106 de la secuencia de referencia H-2EB*01 (SEQ ID NO: 2) o uno o más de los restos de cisteína en localizaciones equivalentes en un isotipo de MHC de clase II alternativo se retiran. Preferentemente, dicha molécula es una molécula soluble.

La presente invención también se refiere a una molécula de MHC de clase II recombinante, que comprende

- 25 (i) toda o parte de la parte extracelular de una cadena α de MHC de clase II;
 (ii) toda o parte de la parte extracelular de una cadena β de MHC de clase II;

en la que (i) y (ii) proporcionan un dominio de unión a péptido funcional y en la que (i) y (ii) se unen mediante un enlace disulfuro entre restos de cisteína localizados en el dominio α_2 de dicha cadena α y el dominio β_2 de dicha cadena β , en la que dichos restos de cisteína no están presentes en dominios α_2 y β_2 de MHC de clase II nativo, y en la que dicha molécula recombinante se expresa en la superficie de un fago filamentosos.

Preferentemente dicho enlace disulfuro se localiza entre restos de cisteína situados en Pro 96 ^{α_2} - Ser 119 ^{β_2} (rango 1), Ser 95 ^{α_2} - Ser 121 ^{β_2} (rango 2) o Arg 94 ^{α_2} - Asn 151 ^{β_2} (rango 3) de un isotipo I-E murino o las localizaciones equivalentes en un isotipo de MHC de clase II alternativo. Preferentemente uno o más de los restos de cisteína correspondientes a las posiciones 38, 42 o 106 de la secuencia de referencia H-2EB*01 (SEQ ID NO: 2) o uno o más de los restos de cisteína en localizaciones equivalentes en un isotipo de MHC de clase II alternativo se retiran. Preferentemente, dicha molécula recombinante se expresa como una fusión con la proteína de superficie del fago gpIII, gpVII, gpVIII o gpIX.

La presente invención también se refiere a un método para producir una molécula de MHC de clase II recombinante, que comprende:

- 45 (i) toda o parte de la parte extracelular de una cadena α de MHC de clase II;
 (ii) toda o parte de la parte extracelular de una cadena β de MHC de clase II;

en la que (i) y (ii) proporcionan un dominio de unión a péptido funcional y en la que (i) y (ii) se unen mediante un enlace disulfuro entre restos de cisteína localizados en el dominio α_2 de dicha cadena α y el dominio β_2 de dicha cadena β , en la que dichos restos de cisteína no están presentes en dominios α_2 y β_2 de MHC de clase II nativo, comprendiendo dicho método expresar dicha molécula recombinante en un hospedador procarriota.

La presente invención también se refiere a un método para identificar epítomos peptídicos antigénicos que pueden reconocerse por linfocitos T, en el que dicho método comprende las etapas de poner en contacto una molécula de MHC de clase II recombinante como se ha definido anteriormente, que comprende además un péptido unido con dicho dominio de unión a péptido con un receptor de linfocitos T y detectar la unión de dicha molécula de MHC de clase II recombinante con dicho receptor de linfocitos T.

La presente invención también se refiere a un método para detectar linfocitos T específicos de antígeno en una muestra, en el que dicho método comprende las etapas de poner en contacto una molécula de MHC de clase II recombinante como se ha definido anteriormente que comprende además un péptido unido a dicho dominio de unión a péptido con dicha muestra y detectar la unión de dicha molécula de MHC de clase II recombinante con dichos linfocitos T. Preferentemente dicho método se usa para detectar la presencia de linfocitos T específicos de enfermedad en una muestra y para diagnosticar la presencia o ausencia de enfermedad.

65 También se desvela en el presente documento una molécula de MHC de clase II recombinante, que comprende:

- (i) toda o parte de la parte extracelular de una cadena α de MHC de clase II;
- (ii) toda o parte de la parte extracelular de una cadena β de MHC de clase II;

en la que (i) y (ii) proporcionan un dominio de unión a péptido funcional y en la que (i) y (ii) se unen mediante un enlace disulfuro entre restos de cisteína localizados en el dominio $\alpha 2$ de dicha cadena α y el dominio $\beta 2$ de dicha cadena β , en la que dichos restos de cisteína no están presentes en dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ de MHC de clase II.

Como se ha mencionado anteriormente, puede ser difícil producir proteínas tales como moléculas de MHC de clase II, que están compuestas de más de un polipéptido y que tienen un dominio transmembrana, fuera del contexto de sus membranas nativas, y en particular en un formato soluble, porque, en muchos casos, la proteína se estabiliza, entre otras cosas, por su región transmembrana y posiblemente componentes accesorios de membrana. Esto sucede para moléculas de MHC de clase II y se refleja en la bibliografía en la que se presentan moléculas de MHC de clase II como inestables, no pueden producirse con buen rendimiento o no pueden reconocer y unirse a péptidos. Por lo tanto, las moléculas de la presente invención representan un importante avance sobre la técnica anterior ya que son estables y también pueden reconocer y unirse con péptidos, así como permitir la tinción de linfocitos T.

Como se ha analizado anteriormente, las moléculas de MHC de clase II nativas comprenden una cadena α y una β , ambas de las cuales tienen regiones transmembrana y pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulina (Ig). La parte extracelular de cada cadena está compuesta de dos dominios, que consisten cada uno en aproximadamente 90 restos de aminoácidos, de los que los dos dominios distales de membrana, los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$, forman una estructura α/β entrecruzada esencial para la propiedad de unión a péptidos de los epítomos de linfocitos T. Los dos dominios proximales de membrana, los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$, forman ambos dominios Ig discretos. En la cadena tanto α como β , un tramo de aproximadamente 20 restos de aminoácidos atraviesan la membrana celular y en el lado citoplasmático de la membrana se localiza un segmento peptídico bastante corto.

Las moléculas de la presente invención comprenden toda o parte de la parte extracelular de una cadena α de MHC de clase II y toda o parte de la parte extracelular de una cadena β de MHC de clase II. La parte extracelular de una cadena α de MHC de clase II comprende una secuencia señal, un dominio $\alpha 1$ distal de membrana y un dominio $\alpha 2$ proximal de membrana (que forma un dominio Ig discreto). También hay una región espaciadora entre el dominio transmembrana y el dominio $\alpha 2$. De forma similar, la parte extracelular de una cadena β de MHC de clase II comprende una secuencia señal, un dominio $\beta 1$ distal de membrana, un dominio $\beta 2$ proximal de membrana (que forma un dominio Ig discreto) y una región espaciadora.

La expresión "parte extracelular de una cadena α del MHC de clase II" como se usa en el presente documento no incluye por lo tanto el dominio transmembrana o el dominio citoplasmático de la cadena α . De hecho, en realizaciones preferidas de la invención las moléculas de MHC de clase II recombinantes no incluyen ninguno de los restos de aminoácidos de dicho dominio transmembrana (es decir, los aminoácidos codificados por los exones transmembrana dedicados) o cualquiera de los restos de aminoácidos de dichos dominios citoplasmáticos.

De forma similar, la expresión "parte extracelular de una cadena β de MHC de clase II", como se usa en el presente documento no incluye por lo tanto el dominio transmembrana o el dominio citoplasmático de la cadena β . De hecho, en realizaciones preferidas de la invención las moléculas de MHC de clase II recombinantes no incluyen ninguno de los restos de aminoácidos de dicho dominio transmembrana (es decir los aminoácidos codificados por los exones transmembrana dedicados) o cualquiera de los restos de aminoácidos de dichos dominios citoplasmáticos.

Todas las partes extracelulares dichas de la cadena α y/o β pueden estar presentes en las moléculas recombinantes de la invención (es decir, el péptido señal, el dominio $\alpha 1/\beta 2$, el dominio $\alpha 2/\beta 2$ y la región espaciadora). Sin embargo, como alternativa, solamente es necesario que esté presente parte de la parte extracelular de la cadena α y/o β en las moléculas de la invención siempre que las moléculas recombinantes aún sean funcionales con respecto a su capacidad para unirse con un péptido apropiado, por ejemplo un péptido efector de linfocitos T, y siempre que dichas moléculas contengan los restos de cisteína artificiales (no nativos) en forma o configuración tal que puedan usarse para formar el enlace disulfuro que actúa para estabilizar la molécula de MHC de clase II recombinante.

El péptido señal puede omitirse de las cadenas α y/o β de las moléculas de MHC recombinantes de la invención, en particular si la molécula de MHC de clase II va a expresarse en células procariotas. Dichas construcciones en las que se omite el número apropiado de restos de aminoácidos N terminales pueden diseñarse fácilmente y producirse por un experto en la materia. También pueden ensayarse fácilmente con respecto a si dichas omisiones tienen un efecto en la función, por ejemplo capacidad de unirse con el péptido o activar o teñir linfocitos T, o en la estabilidad de la molécula.

La región espaciadora también puede omitirse en su totalidad o puede truncarse, por ejemplo como se muestra en los Ejemplos experimentales en los que no se incluyen ninguno del espaciador de la cadena α y se incluyen 9 aminoácidos del espaciador de la cadena β . De nuevo, dichas construcciones en las que el número apropiado de restos de aminoácidos espaciadores se omiten puede diseñarse fácilmente y producirse por un experto en la

materia. También pueden ensayarse con respecto a si dichas omisiones tienen un efecto en la función, por ejemplo la capacidad para unirse con el péptido o activar o teñir linfocitos T, o sobre la estabilidad de la molécula.

Las moléculas preferidas de la invención comprenden al menos una parte de un dominio $\alpha 1$ y al menos una parte de un dominio $\beta 1$ siempre que la función de dichos dominios para unirse con péptidos u otras funciones como se describe en el presente documento, por ejemplo para presentar dichos péptidos a receptores de linfocitos T (TCR), no se efectúen. Además, la molécula de MHC de clase II recombinante en su conjunto debe ser aún funcional con respecto a la capacidad para unirse con péptidos u otras funciones como se describe en el presente documento, por ejemplo, para presentar dichos péptidos a receptores de linfocitos T (TCR). Preferentemente están presentes dominios $\alpha 1$ y/o $\beta 1$ completos o de longitud completa, o dominios $\alpha 1$ y/o $\beta 1$ esencialmente completos o esencialmente de longitud completa, en los que dichos dominios esencialmente completos o esencialmente de longitud completa contienen variaciones de la secuencia nativa, por ejemplo adiciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos, que no afectan a la función de dichos dominios para unirse con péptidos u otras funciones como se describe en el presente documento, por ejemplo para presentar dichos péptidos a receptores de linfocitos T (TCR). La determinación de qué restos de aminoácidos pueden mutarse, modificarse o suprimirse sin afectar a dicha función estaría dentro de la experiencia de un experto en la materia. Otras funciones preferidas para conservar por las moléculas de MHC de clase II son la capacidad para activar linfocitos T y más preferentemente la capacidad para teñir linfocitos T.

Por lo tanto, estas moléculas preferidas de la invención comprenden suficientes restos de los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ para poder unirse con péptidos, por ejemplo para presentar dichos péptidos a TCR, activar linfocitos T o permitir la tinción de linfocitos T.

Otras moléculas preferidas de la invención comprenden al menos una parte de un dominio $\alpha 2$ y al menos una parte de un dominio $\beta 2$ siempre que los restos de cisteína no nativos que se usan para formar el enlace disulfuro estén presentes. Es necesario que dichos restos de cisteína estén presentes en orientaciones y distancias apropiadas entre sí de modo que el enlace disulfuro pueda formarse entre los restos de cisteína y pueda actuar para estabilizar la molécula de MHC de clase II recombinante. Además, la molécula de MHC de clase II en su conjunto aún debe ser funcional con respecto a la capacidad para unirse con péptidos u otras funciones como se describe en el presente documento, por ejemplo para presentar dichos péptidos a receptores de linfocitos T (TCR). Preferentemente están presentes dominios $\alpha 2$ y/o $\beta 2$ completos o de longitud completa, o están presentes dominios $\alpha 2$ y/o $\beta 2$ esencialmente completos o esencialmente de longitud completa, en los que dichos dominios esencialmente completos o esencialmente de longitud completa contienen variaciones de la secuencia nativa, por ejemplo adiciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos, que no afectan a la formación del enlace disulfuro entre los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ y la estabilización posterior de la molécula de MHC de clase II recombinante y no efectúan de forma deletérea el plegamiento de los dominios $\alpha 2$ o $\beta 2$. La determinación de qué restos de aminoácidos pueden mutarse, modificarse o suprimirse sin afectar a dicha función estaría dentro de la experiencia de un experto en la materia.

La localización de aminoácidos de los diversos dominios estructurales y funcionales y regiones de las cadenas α y β del MHC de clase II se conocen bien y se describen en la técnica, por ejemplo Burrows *et al*, 1999, mencionado anteriormente. La localización de los diversos dominios también se muestra en la Figura 3 y dicha información puede usarse fácilmente para diseñar las moléculas recombinantes de la invención como se describe en el presente documento (véase por ejemplo Figura 7).

Un experto en la materia también conocería bien ensayos funcionales apropiados para evaluar la capacidad de las moléculas recombinantes de la invención para unirse con péptidos, para activar linfocitos T o para teñir linfocitos T e incluirían por ejemplo técnicas de resonancia de plasmón superficial (SPR) tales como Biacore y técnicas de citometría de flujo tales como FACS. El uso de citometría de flujo se prefiere particularmente ya que este puede usarse en combinación con células vivas.

La expresión "enlace disulfuro" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier enlace disulfuro, por ejemplo un enlace disulfuro modificado técnicamente o artificial, que se forma entre restos de cisteína localizados en el dominio $\alpha 2$ de la cadena α y el dominio $\beta 2$ de la cadena β de un heterodímero de MHC de clase II (es decir, es un enlace disulfuro intercatenario en lugar de intracatenario). Dichos enlaces disulfuro forman un enlace covalente entre la cadena α y la cadena β y actúan para estabilizar el heterodímero de MHC de clase II. Por lo tanto, las moléculas recombinantes de la invención son estables pero conservan funcionalidad completa, por ejemplo, conservan su especificidad nativa hacia sus ligandos del receptor de linfocitos T afines, y preferentemente conservan su capacidad para activar linfocitos T o teñir linfocitos T.

La propiedad de una molécula de MHC de clase II de la invención de ser estable o estabilizarse puede evaluarse por métodos bien conocidos tales como resistencia aumentada a desnaturalización térmica (medida por ejemplo por ELISA, SPR, o dicroísmo circular). Un ensayo más preferido es evaluar con respecto a heterodímeros conservados en un gel SDS PAGE. Pueden verse fácilmente heterodímeros unidos por enlaces disulfuro estables e intactos en un gel SDS PAGE en condiciones no reductoras, en las que puede visualizarse una banda en un peso molecular

apropiado correspondiente a un heterodímero intacto. Se muestra un ensayo apropiado en los Ejemplos, véase Figuras 5 y 10.

Dichos enlaces disulfuro se forman entre restos de cisteína que no están presentes normalmente en dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ del MHC de clase II nativos. Por lo tanto, dichos restos de cisteína se modifican técnicamente o se introducen artificialmente, por ejemplo por mutación específica de sitio de restos distintos de cisteína apropiados en la molécula nativa a restos de cisteína, permitiendo de este modo la formación de un enlace disulfuro entre los restos de cisteína recién introducidos en los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$. Dichos enlaces también pueden describirse como enlaces disulfuro internos.

Los restos apropiados para mutación a cisteína preferentemente tienen carbonos β respectivos que están a aproximadamente 6 Å (0,6 nm), 7 Å (0,7 nm) o menos de distancia, por ejemplo, en el intervalo de 4 Å (0,4 nm) o 5 Å (0,5 nm) a 6,5 Å (0,65 nm) o 7 Å (0,7 nm), preferentemente en el intervalo de 5 Å (0,5 nm) a 6,5 Å (0,65 nm), más preferentemente en el intervalo de 4 Å (0,4 nm) o 5 Å (0,5 nm) a 5,6 Å (0,56 nm), o 6 Å (0,6 nm) de distancia en el heterodímero del MHC de clase II nativo. Se conservan sitios preferidos para mutación entre especies y entre isoformas e isotipos dentro de una especie particular. En particular, se conservan sitios preferidos para mutación entre secuencias del MHC de clase II de ratón y humanas o se conservan entre los isotipos de MHC de clase II humano, tales como DP, DQ y DR o entre los isotipos de ratón tales como I-E e I-A.

Como alternativa, o además, se identifican sitios preferidos para mutación por una evaluación estructural basada en superposición tridimensional de estructuras cristalinas. De esta manera, pueden examinarse restos que forman la interfaz entre los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ y pueden seleccionarse cadenas laterales con carbonos β a una distancia de 7 Å o menos (o de hecho cualquiera de las otras distancias o intervalos descritos anteriormente) para el análisis adicional o mutación a restos de cisteína. Los expertos en la materia conocerían bien métodos para llevar a cabo dicha evaluación estructural. Por ejemplo, están libremente disponibles estructuras cristalinas de moléculas de MHC de clase II para llevar a cabo este análisis, por ejemplo a partir del Banco de Datos de Proteínas RCSB PDB. También están disponibles en la técnica software apropiado u otros medios para llevar a cabo dicha superposición tridimensional de estructuras cristalinas, por ejemplo, usando software libremente disponible tal como PyMOL, MOLMOL, DeepView o sitios web dedicados tales como iSuperpose.

Son pares de sitios especialmente preferidos en los que se introducen cisteínas para formar enlaces disulfuro uno o más de los siguientes pares, es decir uno o más de Pro $96^{\alpha 2}$ - Ser $119^{\beta 2}$ (rango 1), Ser $95^{\alpha 2}$ - Ser $121^{\beta 2}$ (rango 2), Arg $94^{\alpha 2}$ - Asn $151^{\beta 2}$ (rango 3), Phe $148^{\alpha 2}$ - Gly $152^{\beta 2}$ (rango 4), Pro $96^{\alpha 2}$ - Thr $101^{\beta 2}$ (rango 5), Pro $96^{\alpha 2}$ - Ser $121^{\beta 2}$ (rango 6), Ile $106^{\alpha 2}$ -Asn $151^{\beta 2}$ (rango 7) y Ser $95^{\alpha 2}$ - Asp $122^{\beta 2}$ (rango 8). Los pares se clasifican según la proximidad de los carbonos β y aunque puede usarse cualquiera de estos pares, se prefieren los pares clasificados de 1 a 4 o de 1 a 3. Se prefiere particularmente el par de rango 1 o rango 2.

La localización del aminoácido y naturaleza del aminoácido nativos en esa localización en los pares de restos localizados en los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ y descritos anteriormente son apropiados para moléculas de MHC de clase II del isotipo I-E murino. La numeración de aminoácidos se refiere a los aminoácidos del péptido maduro (es decir la numeración excluye el péptido señal). Una secuencia de referencia ejemplar que puede usarse para identificar la localización de los restos de cisteína modificados es la secuencia I-E proporcionada en la base de datos IMGT, que se muestra en la Figura 3 (indicada como H-2EA*02 para la cadena α (SEQ ID NO: 1) y H-2EB*01 para la cadena β (SEQ ID NO: 2)). De hecho, los restos de las posiciones de rango 1, rango 2 y rango 3 se marcan en sombreado en negro en la Figura 3, y las posiciones de los otros restos clasificados pueden determinarse fácilmente a partir de la Figura 3.

Por lo tanto, a no ser que se indique de otro modo, la numeración y naturaleza de los restos de aminoácidos del MHC de clase II descritos en el presente documento siguen el sistema de IMGT descrito en Lefranc, M-P., *et al.*, 2009 (Nuc. Acids Res., 37: D1006-D1012, número de base de datos) junto con las bases de datos de IMGT halladas en las siguientes referencias web: <http://imgt.cines.fr>; <http://www.imgt.org>. También se proporcionan números de referencia de Genbank relevantes en los Ejemplos. Por ejemplo, para el H-2E (I-E murino) los números de referencia relevantes son K00971 (cadena α) y AF050157 (cadena β).

En realizaciones preferidas de la invención el enlace disulfuro se localiza entre restos de cisteína situados en restos correspondientes a Pro $96^{\alpha 2}$ - Ser $119^{\beta 2}$ (rango 1), Ser $95^{\alpha 2}$ - Ser $121^{\beta 2}$ (rango 2) o Arg $94^{\alpha 2}$ - Asn $151^{\beta 2}$ (rango 3) de los polipéptidos maduros de un isotipo I-E murino o las localizaciones equivalentes en un isotipo del MHC de clase II alternativo. Se proporcionan en el presente documento secuencias de referencia para determinar la localización de dichos restos de cisteína.

Los pares de sitios anteriormente analizados también se muestran en la Tabla 2 usando numeración 1FNG, es decir uno o más de Pro $96^{\alpha 2}$ - Ser $118^{\beta 2}$ (rango 1), Ser $95^{\alpha 2}$ -Ser $120^{\beta 2}$ (rango 2), Arg $94^{\alpha 2}$ - Asn $150^{\beta 2}$ (rango 3), Phe $148^{\alpha 2}$ - Gly $151^{\beta 2}$ (rango 4), Pro $96^{\alpha 2}$ - Thr $100^{\beta 2}$ (rango 5), Pro $96^{\alpha 2}$ - Ser $120^{\beta 2}$ (rango 6), Ile $106^{\alpha 2}$ - Asn $150^{\beta 2}$ (rango 7) y Ser $95^{\alpha 2}$ - Asp $121^{\beta 2}$ (rango 8) y numeración IMGT. Para la numeración 1FNG, la numeración de aminoácidos de la Tabla 2 corresponde a la numeración en la base de datos del Banco de Datos de Proteínas (PDB) de información de

estructura tridimensional de macromoléculas biológicas, número de entrada PDB ID: 1FNG, y puede verse que la localización de los restos apropiados en la cadena β de esta entrada de base de datos son un aminoácido menos que los restos equivalentes en la secuencia de base de datos IMGT. Por lo tanto, esta nomenclatura es ligeramente diferente.

5 Los restos equivalentes a los mostrados en la tabla 2 y Figura 3 pueden identificarse fácilmente en otros isotipos murinos, por ejemplo isotipos I-A, o isotipos humanos, por ejemplo mediante alineamiento usando software apropiado tal como software Clustal. De hecho, se muestra un alineamiento con un isotipo de I-A murino en la Figura 3. Además, se muestran alineamientos ejemplares con alotipos de MHC de clase II HLA-DP, -DQ y -DR en la Figura 7. La localización de los restos equivalentes a los del rango 1, 2 y 3 mostrados en la Tabla 2 y Figura 3 están marcados en sombreado negro en la Figura 7A para la cadena α y en la Figura 7b para la cadena β , y las posiciones de los otros restos clasificados pueden determinarse fácilmente a partir de la Figura 7. Puede verse que las posiciones $\alpha 2$ y $\beta 2$ mostradas en la Tabla 2 y Figura 3 están completamente conservadas en todo el repertorio de HLA humano.

15 Por lo tanto, los alineamientos de secuencia mostrados en la Figura 7 junto con la información anterior pueden usarse para localizar fácilmente los restos apropiados para mutar a cisteínas en los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ de cualquier alelo de MHC de clase II humano para formar el rango deseado de enlace disulfuro. Pueden usarse métodos de alineamientos similares para identificar los restos equivalentes en cualquier otra especie o isotipo.

20 El enlace disulfuro que estabiliza uniones como se analiza en el presente documento es compatible con otros métodos y medios para estabilizar moléculas de MHC de clase II tales como las descritas en la técnica anterior. Por ejemplo, los enlaces disulfuro pueden usarse junto con diversos motivos de dimerización tales como motivos de cremallera de leucina (por ejemplo como se describe en Quarsten *et al.*, 2001 y Crawford *et al.*, 2006, mencionado anteriormente), o junto con fusiones de Ig (es decir, fusiones con una parte Fc de una inmunoglobulina, por ejemplo como se describe en Casares *et al.*, 1997, mencionado anteriormente) y las moléculas de la invención, junto con los vectores que las codifican, pueden diseñarse de forma apropiada.

25 Como se describe en otra parte en el presente documento se prefiere la expresión o producción de las moléculas de la invención en hospedadores procariontes, por ejemplo, bacterianos, y en dichas realizaciones, particularmente en realizaciones en las que se aíslan moléculas de cuerpos de inclusión, se prefiere que no se usen motivos de cremallera de leucina u otros motivos de dimerización.

30 También se desvela en el presente documento una molécula de MHC de clase II recombinante capaz de expresarse en un hospedador bacteriano, que comprende:

en la que (i) y (ii) proporci

(i) toda o parte de la parte extracelular de una cadena α de MHC de clase II;

(ii) toda o parte de la parte extracelular de una cadena P de MHC de clase II;

35 en la que (i) y (ii) proporcionan un dominio de unión a péptido funcional y en la que (i) y (ii) se unen mediante un enlace disulfuro entre restos de cisteína localizados en el dominio $\alpha 2$ de dicha cadena α y el dominio $\beta 2$ de dicha cadena β , en la que dichos restos de cisteína no están presentes en dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ de MHC de clase II nativo.

40 Otro aspecto preferido proporciona una molécula de MHC de clase II recombinante, que comprende:

(i) toda o parte de la parte extracelular de una cadena α de MHC de clase II;

(ii) toda o parte de la parte extracelular de una cadena β de MHC de clase II;

45 onan un dominio de unión a péptido funcional y en la que (i) y (ii) se unen mediante un enlace disulfuro entre restos de cisteína localizados en el dominio $\alpha 2$ de dicha cadena α y el dominio $\beta 2$ de dicha cadena β , en la que dichos restos de cisteína no están presentes en dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ de MHC de clase II nativo, y además en la que dicha molécula recombinante no comprende un motivo de cremallera de leucina. En otras realizaciones, no se incluye un motivo de dimerización. En estas realizaciones se prefiere que la molécula de MHC de clase II recombinante sea capaz de expresarse en un hospedador procarionte, por ejemplo bacteriano.

50 Aunque las uniones de enlaces disulfuro de la invención pueden usarse junto con otros métodos y medios para estabilizar las moléculas de MHC de clase II, dichos enlaces disulfuro pueden proporcionar los únicos medios para estabilizar las moléculas de MHC de clase II. De hecho, se prefieren dichas realizaciones. La expresión "único medio para estabilizar las moléculas de MHC de clase II" como se usa en el presente documento se refiere a los enlaces disulfuro que proporcionan los únicos medios para estabilizar las moléculas más allá de cualquier estabilización que exista de forma natural o inherentemente en una molécula de MHC de clase II particular, por ejemplo, los enlaces disulfuro de la invención proporcionan los únicos medios artificiales, o modificados técnicamente, o no nativos para estabilizar las moléculas de MHC de clase II. Por lo tanto, dichas realizaciones excluyen el uso de otros medios de estabilización descritos en la técnica tales como cremalleras de leucina u otros motivos de dimerización.

65

El hallazgo sorprendente de que dichos enlaces disulfuro son suficientes para estabilizar moléculas de MHC de clase II sin ningún medio no nativo adicional de estabilización tal como un motivo de dimerización se demuestra elegantemente en los datos proporcionados en el presente documento en los que dichas moléculas se presentan en una forma estable y funcional en la superficie de fago filamentosos. Este hallazgo fue particularmente sorprendente dados los hechos de que las moléculas modificadas técnicamente, que se construyen en la topología de pliegue de Ig, se expresaron en un hospedador procariota. El pliegue Ig, que en la naturaleza solamente aparece en el dominio de vida eucariota, requiere que se formen enlaces S-S intradominios conservados entre cisteínas nativas (Halaby, D.M., *et al.*, 1999, *Protein Eng.*, 12 (7): 563)) para alcanzar su topología funcional. Se acepta por lo tanto en general que cuando dichas moléculas se expresan en un hospedador procariota, que carece inevitablemente de la maquinaria de chaperona compleja de la célula eucariota requerida para la formación de enlace S-S correcta, es prominente la formación de enlace S-S aberrante, dando como resultado falta de expresión funcional. Las estrategias de modificación técnica que implican un número aumentado de cisteínas, sin hablar de formación de enlaces S-S artificiales definidos en estos sistemas, se consideran por lo tanto en general no viables. En el presente documento se proporcionan claramente pruebas de que esto no es verdad, ya que se presentan moléculas funcionales en el fago como se muestra por formación de dímeros covalentes (Figuras 5 y 10) que muestran unión específica con el ligando afín (Figura 6 y Figura 9).

En una realización, las cadenas α y β de las moléculas de MHC de clase II de la invención también comprenden enlaces disulfuro intracatenarios, por ejemplo enlaces disulfuro intracatenarios de origen natural que existen entre restos de cisteína de origen natural. Dichos enlaces disulfuro intracatenarios de origen natural pueden existir por ejemplo en los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ para formar la topología del pliegue de Ig de estos dominios. Además, la mayoría de las moléculas de MHC de clase II albergan un enlace disulfuro intradominio en el dominio $\beta 1$ que conecta el suelo de la lámina β con la parte de hélice α . Lo que es más importante, muchas moléculas de MHC de clase II contienen una cisteína libre adicional en el suelo de lámina β del dominio $\beta 1$, que no participa en ninguna formación de enlace disulfuro pero que podrían formar enlaces disulfuro erróneos con los restos de cisteína no nativos recién introducidos. Por lo tanto, en realizaciones preferidas de la invención, en particular en realizaciones en las que se usa expresión procariota, este resto se retira, por ejemplo por mutación a un resto alternativo que conserva la estructura general, tal como serina o alanina. Un experto en la materia sería capaz fácilmente de localizar este resto de cisteína en cualquier alelo de MHC de clase II. Por ejemplo, esta cisteína corresponde al resto 38 de la cadena β en la secuencia de referencia de IMGT de longitud completa H-2EB*01 mostrada en la Figura 3B (SEQ ID NO: 2), o resto 12 en la secuencia de referencia de IMGT madura (es decir sin el péptido señal).

Las otras cisteínas de dominio $\beta 1$ (que forman un enlace) pero que también podrían contribuir a formación de enlaces disulfuro erróneos con los restos de cisteína no nativos recién introducidos también podrían localizarse fácilmente por un experto en la materia. Por ejemplo, estos se localizan en los restos 42 y 106 en la secuencia de referencia de IMGT de longitud completa H-2EB*01 mostrada en la Figura 3B (SEQ ID NO: 2), o los restos 16 y 80, respectivamente, de la secuencia de referencia de IMGT madura (es decir sin el péptido señal). En realizaciones alternativas y preferidas de la invención no están presentes uno o más de dichos restos de cisteína. Esto puede conseguirse mutando uno o más de los restos de cisteína nativos apropiados a otro resto de aminoácido que no esté implicado en la formación de enlace disulfuro para evitar la formación de enlaces. Serían restos ejemplares para reemplazar las cisteínas los que conservaban la estructura general de la molécula, por ejemplo conservaban los enlaces de hidrógeno. Serían elecciones preferidas Ser o Ala como se ha analizado anteriormente.

La retirada analizada anteriormente de uno o más restos de cisteína nativos debería ayudar por lo tanto a evitar formación de enlaces disulfuro erróneos entre restos de cisteína nativos y los restos de cisteína no nativos recién modificados por ingeniería genética de la invención. Por lo tanto, en realizaciones preferidas de la invención, se retiran uno o más restos de cisteína nativos en el dominio $\beta 1$. En realizaciones especialmente preferidas de la invención, se retiran uno o más de los restos de cisteína correspondientes a las posiciones 38, 42 o 106 de la secuencia de referencia de longitud completa H-2EB*01 (SEQ ID NO: 2), (o los restos equivalentes en la secuencia de referencia madura) o uno o más restos de cisteína en localizaciones equivalentes en un isotipo de MHC de clase II alternativo.

La expresión "dominio de unión a péptido funcional" como se usa en el presente documento se refiere a un dominio en la molécula de MHC de clase II recombinante de la invención que es capaz de unirse a un péptido, por ejemplo un péptido efector de linfocitos T o un péptido antigénico. Dicha unión a péptido debería ser a un nivel detectable y los expertos en la materia conocerían bien métodos para detectar la unión, por ejemplo técnicas de resonancia de plasmón superficial (SPR) o técnicas de citometría de flujo. En algunas realizaciones, dichos péptidos se unen de tal manera que permiten la presentación de dicho péptido a un TCR, o al menos para ensayar si dicho péptido es capaz o no de presentarse a un TCR.

Preferentemente dichos péptidos se unen o se asocian con la molécula de MHC de clase II de tal manera que permitan la unión de un TCR con el complejo de pMHC. Más preferentemente dicha interacción con un TCR permite que los linfocitos T que reconocen el complejo pMHC se tiñan o se visualicen de otro modo. Preferentemente dicho dominio de unión a péptido es capaz de unirse con un péptido y después iniciar la activación de linfocitos T mediante el TCR, por ejemplo es capaz de inducir que los linfocitos T auxiliares secreten por ejemplo citocinas tales como IL-

2, o induzcan proliferación (medida por ejemplo por incorporación de BrdU como cpm). Dichos dominios de unión a péptidos se forman en general por restos de los dominios α 1 y β 1 de las moléculas de MHC de clase II.

5 Las moléculas de MHC de clase II de la invención pueden proporcionarse en una forma vacía o no cargada, es decir sin un péptido unido con el dominio de unión a péptido descrito anteriormente (es decir sin péptido). En este caso, las moléculas de MHC de clase II pueden después cargarse posteriormente con cualquier péptido apropiado *in vitro*. Dicha carga *in vitro* es ventajosa sobre muchas moléculas de MHC de clase II de la técnica anterior que, para ayudar a estabilizar el heterodímero de la clase II, tienen que producirse con péptidos unidos, por ejemplo mediante la producción de los péptidos como proteína de fusión covalente con la cadena β de MHC mediante un enlazador
10 corto. La carga *in vitro* permite que se produzca una molécula de MHC de clase II verdaderamente genérica sin tener que proporcionar un vector de expresión diferente para cada complejo de MHC-péptido diferente.

15 En algunas realizaciones de la invención, las moléculas de MHC de clase II recombinantes tienen péptidos unidos con o asociados con el dominio de unión a péptido descrito anteriormente. Puede usarse cualquier péptido que sea adecuado para unirse o asociarse con el dominio de unión a péptido formado por los restos de los dominios α 1 y β 1 de las moléculas de MHC de clase II. En general dichos péptidos son de 12-25 unidades y habitualmente protruyen en ambos extremos del surco formado por los dominios α 1 y β 1.

20 En moléculas de MHC de clase II nativas dichos péptidos derivan de antígenos exógenos. En la presente invención, puede usarse cualquiera de dichos péptidos. Por ejemplo, se han identificado algunos péptidos efectores de linfocitos T específicos que se presentan por moléculas de MHC de clase II y dan como resultado la unión de TCR y activación de linfocitos T y se han documentado en la técnica y puede usarse cualquiera de estos junto con la presente invención. En particular, ciertos péptidos presentados en moléculas de MHC de clase II se han identificado como asociados con enfermedades particulares y en realizaciones de la invención en las que las moléculas de MHC
25 de clase II recombinantes se asocian con péptido, se prefieren dichos péptidos específicos de enfermedad. Algunos de estos péptidos se describen en la técnica y otros se identificaran en el futuro; cualquiera de estos péptidos será adecuado para uso con las moléculas de MHC de clase II descritas.

30 Péptidos ejemplares que se asocian o se unen con el dominio de unión a péptido de moléculas de MHC de clase II son α -II-gliadina humana (N-PQPELPYPQPE-C), que se ha descubierto que se presenta en moléculas de MHC de clase II HLA-DQ2 y que se asocia con la enfermedad celíaca; $h\kappa$ ^{aa40-48} humano (N-WKIDGSERQ-C), que se ha descubierto que se presenta en moléculas de MHC de clase II HLA-DR4 y que se asocia con la artritis reumatoide; T ^{aa947-967} humano (N-FNNFTVSWFLRVPKVSASHLE-C) que se ha descubierto que se presenta en moléculas de MHC de clase II HLA-DP1 y que se asocia con el tétanos; y un péptido derivado de hemaglutinina (HA) de *H. influenza* (aa110 - 120: N-SFERFEIFPKE-C), que se ha descubierto que se presenta en moléculas de I-E^d de clase II
35 de ratón.

40 Como alternativa, pueden usarse otros péptidos, por ejemplo para identificar si dichos péptidos pueden unirse con el dominio de unión a péptido y también si pueden permitir la unión de linfocitos T y preferentemente tinción de linfocitos T mediante el TCR o permiten la activación de linfocitos T. De esta manera las moléculas de la invención pueden usarse para identificar péptidos nuevos y previamente desconocidos (por ejemplo péptidos antigénicos) que actúan como epítopos de linfocitos T.

45 Como alternativa, las moléculas de MHC de clase II recombinantes pueden asociarse con péptidos efectores distintos de linfocitos T o irrelevantes (denominados péptidos "de relleno") que pueden liberarse de la molécula de MHC de clase II mediante escisión de un enlazador uniéndolo con la molécula de MHC y pueden después reemplazarse con péptidos efectores de linfocitos T de interés en una reacción de intercambio de péptido *in vitro*.

50 La unión o asociación de dichos péptidos con la molécula de MHC de clase II puede facilitarse de cualquier manera apropiada. Por ejemplo, es posible modificar técnicamente las construcciones de la invención de modo que se produzcan dichos péptidos junto con las moléculas de MHC de clase II (por ejemplo codificándolos en la misma construcción, por ejemplo codificándolos unidos de forma covalente con la cadena β del MHC de clase II o la cadena α del MHC de clase II mediante una secuencia enlazadora apropiada, o una construcción diferente en la misma célula hospedadora) permitiendo de este modo la producción de moléculas de MHC de clase II recombinantes que
55 presentan o se unen con o asocian con dicho péptido adecuado para reconocimiento por linfocitos T auxiliares apropiados. Se describen métodos apropiados para producir dichas moléculas asociadas a péptidos en Kozono *et al.* 1994 (Nature, 369: 151-154). Los métodos de Kozono usan un enlazador de 18 restos de aa, sin embargo en realizaciones preferidas de la invención se usa un enlazador más corto tal como un enlazador de 15 aa (por ejemplo enlazadores Gly-Ser tales como (G₄S)₃) o un enlazador de 6, 7 u 8 restos aa (por ejemplo enlazadores Gly-Ser tales como GSGSGS, GGS₂SGS, SGSGSGS o SGGSGSGS), más preferentemente un enlazador de 6 restos aa.
60

65 La presente invención es aplicable en general a cualquier tipo de molécula de MHC de clase II, por ejemplo es aplicable a moléculas de MHC de clase II de cualquier especie y cualquier subtipo de moléculas de MHC de clase II dentro de esa especie. En particular, los restos identificados en el presente documento para mutación a restos de cisteína no nativos para permitir la formación de uno o más enlaces disulfuro intercatenarios están conservados

entre especies, apoyando de este modo la generalidad del enfoque. La presente invención puede aplicarse por lo tanto a todas las moléculas de MHC de clase II de mamífero, por ejemplo, moléculas humanas, de ratón, de rata, de cerdo, de cabra y de oveja, en particular humanas y de ratón. Por ejemplo, la presente invención es aplicable a moléculas de MHC de clase II humanas DP, DQ y DR (es decir los tres tipos funcionales identificados de moléculas de MHC de clase II en seres humanos) y también a moléculas I-A e I-E de ratón (por ejemplo moléculas I-E^d e I-E^k, preferentemente I-E^d). Se muestran otros ejemplos de moléculas I-A e I-E en la Tabla posterior.

Alelo de MHC expresado por cepas de ratón endogámicas usadas habitualmente

			H-2				
			Clase I			Clase II	
Cepa	Apariencia	Haplotipo	K	D	L	IA	IE
Básica	alino	d	Kd	Dd	Ld	Iad	Ied
C3H/He	agouti	k	Kk	Dk	-	Iak	Iek
C57BL/6	negra	b	Kb	Db	-	Iab	-
CBA	agouti	k	Kk	Dh	-	Iak	Iek

10 Más preferentemente las moléculas de MHC de clase II son humanas.

Como los restos identificados para mutación a cisteína están conservados entre especies un experto en la materia podría identificar fácilmente los restos correspondientes, equivalentes y apropiados para mutación en cualquier molécula de MHC de clase II de cualquier especie y por lo tanto producir moléculas de MHC de clase II recombinantes estabilizadas por uno o más enlaces disulfuro intercatenarios apropiados.

En una realización de la invención la molécula de MHC de clase II recombinante de la presente invención que no comprende un motivo de cremallera de leucina se expresa en la superficie de una célula u otra entidad biológica o paquete o la molécula de MHC de clase II de la presente invención se expresa en la superficie de un fago filamentoso. Este formato puede denominarse en ocasiones en el presente documento formato "no soluble" o moléculas "no solubles". En dichas realizaciones, la cadena α o la cadena β de las moléculas de MHC de clase II de la invención se modifican técnicamente en general como proteínas de fusión con una proteína que se expresa normalmente en la superficie de la entidad en cuestión o se incluyen o asocian de otro modo con la superficie de la entidad en cuestión.

Se prefiere expresión como una fusión con una proteína de superficie de fago y en dichas realizaciones se prefiere la fusión de la cadena α o la cadena β de las moléculas de MHC de clase II de la invención con cualquier proteína de superficie de fago apropiada. Son ejemplos preferidos fusiones con gpIII, gpVIII, gpVII o gpIX, más preferentemente gpIII. La metodología para la expresión de moléculas de MHC de clase II de la invención en la superficie de partículas de fagos estaría dentro de la experiencia de un experto en la materia y se describen técnicas y métodos ejemplares en los Ejemplos. Se describe metodología preferida por ejemplo en el documento WO09/024591.

En realizaciones alternativas de la invención, las moléculas de MHC recombinantes son moléculas solubles que no comprenden un motivo de cremallera de leucina, por ejemplo moléculas de MHC de clase II de la invención que no se asocian con o se expresan en la superficie de una célula u otra entidad biológica tal como una fusión con proteína de la cápsida viral u otras proteínas que dan como resultado la asociación con o formación de complejo con la superficie de la entidad biológica. Las moléculas solubles ejemplares incluyen por lo tanto moléculas que comprenden solamente las partes extracelulares (i) y (ii) de las moléculas de la invención, pero también incluyen dichos ectodominios que incluyen otros componentes cortos que no efectúan la solubilidad de las moléculas tales como extensiones C terminales cortas tales como marcadores de afinidad y/o motivos de dimerización. Dependiendo del sistema de producción dichas moléculas solubles pueden secretarse de células hospedadoras u obtenerse de células hospedadoras por cualquier otro método apropiado. Dichas moléculas solubles pueden proporcionarse en una forma sustancialmente pura o como una preparación purificada o aislada. Por ejemplo dichas moléculas solubles pueden producirse en una forma que está sustancialmente libre de otras proteínas.

En realizaciones preferidas de la invención, las moléculas de MHC de clase II recombinantes pueden proporcionarse en una forma multimérica por ejemplo con propiedades multivalentes. Dichas formas multiméricas son con frecuencia ventajosas para permitir la unión de moléculas de MHC de clase II con receptores de linfocitos T ya que la afinidad entre un complejo de pMHC individual y un receptor de linfocitos T es generalmente bastante baja. Dichas formas multiméricas comprenden una pluralidad (más de una) de las moléculas de MHC de clase II recombinantes de la invención. Preferentemente cada una de la pluralidad de moléculas de MHC de clase II es idéntica.

Puede usarse cualquier método apropiado para preparar formas multiméricas de moléculas de MHC de clase II, varias de las cuales se describen en la técnica (véase por ejemplo Vollers *et al.*, 2008, mencionado anteriormente). Un modo particularmente ventajoso para preparar formatos multiméricos de las moléculas de MHC de clase II de la invención es usando presentación en la superficie de fago filamentoso. En dichos métodos, la arquitectura natural de

- las moléculas de fagos puede aprovecharse para producir multímeros seleccionando la proteína estructural de fago apropiada con la que se fusionan y asocian las moléculas de MHC de clase II. Por ejemplo puede usarse la fusión con el gpIII, gpVII o gpIX, preferentemente gpIII, para conseguir 3 a 5 copias de las moléculas de MHC de clase II en la superficie de cada partícula de fago. Puede usarse fusión con gpVIII para conseguir muchas más copias (en el fago de tipo silvestre hay aproximadamente 2700 copias de gpVIII). Por lo tanto, resulta importante que pVIII presenta aumentos de la valencia de MHC en al menos una orden de magnitud en comparación con tecnología tanto de presentación de gpIII como de tetrámeros clásicos, lo que da como resultado un gran aumento de la sensibilidad. Esto debería abrir aplicaciones nuevas e interesantes.
- Pueden usarse técnicas de diseño de construcciones y presentación de fagos conocidas, por ejemplo el uso de construcciones de fagémidos y tipos modificados de fagos auxiliares, para alterar el número de copias de las moléculas de MHC de clase II en la superficie del fago. Con la capacidad de preparar moléculas de MHC de clase II poliméricas en la superficie del fago, provechosamente esto permite la fabricación o producción de una molécula de MHC de clase II multimérico en un único proceso rápido, rentable. Esto está en claro contraste con la tecnología de tetrámeros convencional tal como la descrita en Vollers *et al.*, 2008, en la que cada componente se produce por separado, se mezcla, forma complejo y se purifica antes de que el reactivo sea adecuado para aplicaciones corriente abajo.
- Los multímeros preferidos comprenden por lo tanto comprenden dos, tres, cuatro o cinco o más moléculas de MHC de clase II recombinantes asociadas entre sí. Dicha asociación puede llevarse a cabo usando métodos conocidos y descritos en la técnica pero está mediada en general por otro enlace tal como una molécula enlazadora. Se conocen bien y se describen en la técnica moléculas enlazadoras adecuadas y moléculas enlazadoras particularmente apropiadas tendrán múltiples sitios de unión con los que pueden unirse las moléculas recombinantes. Por ejemplo, pueden usarse múltiples moléculas de unión tales como avidina y estreptavidina (o cualquier otra molécula que se una con biotina de una manera multivalente) que tienen cada una múltiples sitios de unión para biotina. Por lo tanto, la incorporación de biotina en las moléculas de MHC recombinante por métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, usando AviTag u otros sustratos de BirA para permitir la biotinilación enzimática) permitirá la formación de multímeros, por ejemplo tetrámeros de moléculas de MHC. Los marcadores también pueden incorporarse convenientemente en formas multiméricas, por ejemplo, usando estreptavidina fluorescente o mediante la fusión de un marcador con una proteína de cubierta del fago, por ejemplo un tipo diferente de proteína de cubierta que la elegida para presentación de moléculas de MHC de clase II. La incorporación de dichos marcadores permite la detección fácil de los tetrámeros por diversas técnicas conocidas. Por ejemplo el uso de un marcador fluorescente permite usar técnicas de citometría de flujo tales como FACS, lo que es particularmente ventajoso.
- Las moléculas de MHC de clase II de la invención o multímeros de las mismas podrían también recubrir un soporte sólido tal como un soporte sólido planar o en partículas, por ejemplo una membrana, una placa o una perla. Se conocen bien y están documentadas en este campo técnicas para esto.
- Las moléculas de MHC de clase II de la invención y el uso de uno o más enlaces disulfuro modificados técnicamente entre los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ de una molécula de MHC de clase II para estabilizar dicha molécula como se describe en el presente documento son compatibles con todos los métodos de la técnica anterior de producción de moléculas de MHC de clase II. Por lo tanto, la invención es compatible con cualquiera de los formatos previos de moléculas de MHC de clase II descritas en la técnica y deberían mejorar la eficacia de producción y estabilidad del producto. En particular, la invención expande la aplicabilidad y versatilidad de MHC de clase II recombinante ya que dichas moléculas pueden producirse ahora en una forma estabilizada con enlaces disulfuro por ejemplo como (i) moléculas solubles, funcionales, en el periplasma de bacterias, (ii) componentes no funcionales de cuerpos de inclusión bacterianos que pueden solubilizarse y replegarse en entidades funcionales después de purificación, preferentemente con rendimientos sustancialmente mayores que los producidos por los protocolos convencionales actuales (que es un máximo de 30 % del material de partida, véase por ejemplo Arimilli *et al.*, 1995, mencionado anteriormente), (iii) componentes presentados en fagos en sistemas de fagos filamentosos, (iv) fusiones de Ig en células eucariotas; y (v) moléculas de MHC de clase II solubles en células eucariotas.
- Provechosamente, los enfoques (ii), el enfoque de cuerpos de inclusión, y (iii), el enfoque de presentación en fagos, permitirán inmediatamente dos aplicaciones muy importantes para uso eficaz de moléculas de MHC de clase II recombinante, de las que el enfoque (iii) es completamente nuevo. A este respecto, nunca se ha conseguido antes presentación funcional exitosa de pMHC de clase II en viriones de fagos filamentosos y abre un conjunto de aplicaciones nuevas, o mejoradas, tales como (a) bibliotecas peptídicas presentadas en fagos en el contexto de MHC de clase II; (b) producción extremadamente rápida y fácil de cualquier combinación de pMHC de clase II; y (c) presentación en fagos filamentosos multivalentes de moléculas de MHC de clase II como una alternativa a multímeros de pMHC de clase II convencionales tales como tetrámeros, excepto que los viriones pueden producirse a un menor coste y a alta velocidad.
- Las moléculas de MHC de clase II de la invención tienen un valor y uso particular como un reactivo de investigación. Este sucede particularmente para las formas multivalentes descritas en el presente documento y para las formas presentadas en fagos (que pueden diseñarse fácilmente para ser multivalentes debido a la arquitectura inherente de las partículas de fagos en las que se presentan las moléculas de MHC de clase II). Se prefieren por lo tanto para

este uso formas tetraméricas y formas presentadas en fagos de las moléculas de MHC de clase II, en particular formas presentadas en fagos multivalentes. Las formas tetraméricas de las moléculas de MHC de clase II de la invención o formas presentadas en fagos multivalentes pueden usarse como reactivos alternativos preferidos para cualquier aplicación en la que se usen tetrámeros convencionales. Una aplicación preferida en la que pueden usarse las moléculas de la invención como una alternativa a tetrámeros convencionales es en la tinción de MHC de linfocitos T que generalmente implica detección basada en citometría de flujo de linfocitos T usando oligómeros de pMHC tales como dímeros y oligómeros de mayor orden. Los datos presentados en el presente documento muestran que las moléculas de MHC de la presente invención pueden usarse en análisis de citometría de flujo para teñir linfocitos T. Esta es una propiedad altamente ventajosa e importante ya que muchos tetrámeros del MHC de clase II de la técnica anterior son capaces de teñir linfocitos TH específicos de antígeno, incluso si dichos tetrámeros pueden activar linfocitos T. Por lo tanto, las moléculas de MHC de clase II preferidas de la invención tienen la capacidad de teñir de forma detectable linfocitos T, por ejemplo usando citometría de flujo. Esta propiedad se observa particularmente con formas multiméricas o multivalentes de las moléculas, aunque puede observarse tinción de linfocitos T usando formas monoméricas. Una ventaja adicional de formas de presentación en fagos multiméricos es que, en general, pueden usarse títulos menores de fagos para conseguir el mismo resultado, por ejemplo tinción de linfocitos T.

Cuando dichas moléculas de MHC de clase II se proporcionan como reactivos, como se ha descrito anteriormente, se pueden proporcionar con o sin un péptido asociado. Dichos reactivos pueden proporcionarse como proteínas, o como ácidos nucleicos que codifican dichas moléculas de MHC de clase II, por ejemplo en forma de uno o más vectores de expresión.

Dichos reactivos, en particular, cuando se usan para tinción de linfocitos T como se ha descrito anteriormente, pueden usarse para estudiar respuestas de linfocitos T a péptidos particulares, por ejemplo para estudiar el repertorio y la dinámica de respuesta de linfocitos T y para permitir el análisis *ex vivo* directo de linfocitos T CD4 + específicos de antígeno, por ejemplo en sangre periférica. El análisis de sangre periférica ha sido hasta la fecha un reto en lo que se refiere a moléculas de MHC de clase II recombinantes. También pueden usarse para aislar e identificar linfocitos T específicos de antígeno *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Los linfocitos T identificados de este modo pueden someterse a estudio adicional, expansión o activación y tienen potencial para su uso en terapia.

Las moléculas de MHC de clase II recombinantes de la invención también pueden usarse como una plataforma para explorar con respecto a inmunomoduladores. Una etapa crítica en enfermedades que implican el sistema inmunitario es la interacción entre células presentadoras de antígenos y linfocitos T. En particular el complejo del MHC de clase II o células presentadoras de antígenos es crítico ya que se une con péptidos derivados de forma exógena y los presenta a linfocitos T auxiliares. El linfocito T auxiliar se activa después y secreta diversas citocinas que activan una amplia serie de células efectoras.

La provisión de moléculas de MHC de clase II completamente funcionales, estables, tales como las de la presente invención descritas en el presente documento, y en particular formatos solubles de dichas moléculas, es vital para proporcionar una plataforma para explorar con respecto a inmunomoduladores que puedan modular, por ejemplo regular positiva o negativamente, la interacción entre linfocitos T auxiliares y moléculas de MHC de clase II y posterior activación de linfocitos T auxiliares y células efectoras. Hasta la presente invención dicha exploración ha estado obstaculizada por la dificultad para producir moléculas de MHC de clase II estables con alto rendimiento y a bajo coste. Las moléculas de MHC de clase II recombinantes de la invención pueden por lo tanto usarse como una plataforma de exploración para inmunomoduladores.

Se han descrito en otra parte en el presente documento moléculas de MHC de clase II preferidas para su uso en dichos métodos. Preferentemente dichas moléculas de MHC de clase II se asocian con péptidos específicos de enfermedad. Se describen en el presente documento y en la técnica anterior ejemplos de dichos péptidos e incluyen la molécula de HLA-DQ2 humana asociada con péptidos específicos de enfermedad tales como enfermedad celíaca o péptidos específicos de diabetes de tipo I, la molécula de MHC de clase II HLA-DR4 humana asociada con péptidos específicos de enfermedad para artritis reumatoide y la molécula de MHC de clase II HLA-DP1 humana asociada con péptidos de tétanos específicos. Pueden usarse igualmente otros péptidos asociados con moléculas de MHC de clase II de la invención.

Se identifican después linfocitos T que pueden reconocer específicamente dichos péptidos asociados con enfermedad en el contexto de MHC de clase II, por ejemplo usando las moléculas de MHC de clase II de la invención como se ha descrito anteriormente, u obtenerse de otro modo (por ejemplo algunas de dichas líneas celulares ya se han desarrollado por los científicos) después de lo cual puede evaluarse la capacidad de uno o más compuestos para modular la interacción entre linfocitos T y células presentadoras de antígenos o acontecimientos corriente abajo de los mismos, tales como secreción de citocinas y función de células efectoras.

Las moléculas de MHC de clase II recombinantes de la invención, y en particular el formato presentado en fagos de dichas moléculas, pueden usarse en descubrimiento de epítomos, por ejemplo para la identificación y caracterización de epítomos peptídicos antigénicos reconocidos por linfocitos T (epítomos de linfocitos T). Por lo tanto, una realización adicional de la invención proporciona un método para identificar epítomos peptídicos antigénicos que

5 pueden reconocerse por linfocitos T, en el que dicho método comprende las etapas de poner en contacto una molécula de MHC de clase II recombinante de la invención con un receptor de linfocitos T y detectar la unión de dicha molécula de MHC de clase II recombinante con dicho receptor de linfocitos T. La unión del receptor de linfocitos T es indicativa de la presencia de un epítipo peptídico antigénico asociado con la molécula de MHC de clase II, después de lo cual dicho epítipo puede analizarse y caracterizarse adicionalmente.

10 Por ejemplo, puede crearse una biblioteca de epítopos insertando diversidad en el péptido antigénico presentado en el contexto de un MHC fijo. Dichas bibliotecas pueden después explorarse por ejemplo usando TCR recombinantes, solubles, o TCR representados en fagos, u otras poblaciones de linfocitos T, por ejemplo linfocitos T de pacientes. Esta será una mejora importante en comparación con métodos actuales que se basan en bibliotecas de baculovirus de bajo rendimiento y que padecen la desventaja adicional de no poder llevar a cabo selección en células vivas (Crawford *et al.*, 2004, PLoS Biology, 2: 0523-0533).

15 Las moléculas de MHC de clase II de la invención pueden usarse como reactivos de diagnóstico. Por ejemplo, como se describe en otra parte en el presente documento, pueden formarse complejos de péptidos específicos de enfermedad con o asociarse con las moléculas de MHC de clase II de la invención y estos pueden usarse para detectar la presencia o ausencia de linfocitos T específicos de enfermedad en muestras, por ejemplo muestras de sangre, tomadas de un paciente que potencialmente tiene la enfermedad. La presencia de linfocitos T específicos de enfermedad, y en particular números significativos de linfocitos T específicos de enfermedad en comparación por ejemplo con los niveles vistos en un paciente sin enfermedad, indicaría un diagnóstico positivo.

20 Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención proporciona un método para detectar linfocitos T específicos de antígeno en una muestra, en el que dicho método comprende las etapas de poner en contacto una molécula de MHC de clase II recombinante de la invención con dicha muestra y detectar la unión de dicha molécula de MHC de clase II recombinante con dichos linfocitos T. La unión de dicha molécula de MHC de clase II recombinante con linfocitos T es indicativa de la presencia de linfocitos T específicos de antígeno.

25 Dichos métodos pueden usarse para detectar la presencia de linfocitos T específicos de enfermedad en una muestra y para diagnosticar la presencia o ausencia de enfermedad. Son enfermedades apropiadas que pueden diagnosticarse usando dichos métodos en las que se asocian moléculas de MHC de clase II con péptidos específicos de enfermedad. Se describen en otra parte del presente documento enfermedades ejemplares e incluyen enfermedad celíaca, artritis reumatoide, tétanos y gripe.

30 Los linfocitos T específicos de enfermedad capturados y la interacción entre dichos linfocitos T y las moléculas de MHC de clase II de la invención también pueden caracterizarse para entender más completamente los mecanismos detrás de enfermedades específicas. Por lo tanto, este es otro ejemplo de cómo las moléculas de MHC de clase II de la invención pueden usarse como reactivos de investigación, por ejemplo para supervisar y caracterizar respuestas de linfocitos T específicas.

35 Las moléculas de MHC de clase II recombinantes de la invención, cuando están asociadas con péptidos, también puede usarse como una diana en la maduración de afinidad de TCR.

40 Un experto en la materia apreciará que las moléculas de MHC de clase II recombinantes de la invención pueden prepararse de cualquiera de varias maneras bien conocidas y descritas en la técnica, pero más preferentemente se preparan usando métodos recombinantes.

45 Por lo tanto, pueden usarse técnicas de clonación génica para producir una molécula de MHC de clase II de la invención y se desvelan técnicas apropiadas por ejemplo en J. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Por lo tanto, moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia que codifica una cadena (por ejemplo, una cadena α y/o una β) de la molécula de MHC de clase II de la invención, o una secuencia complementaria de la misma forman aspectos adicionales de la invención.

50 Moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena α (es decir cadena (i)) o la cadena β (es decir cadena (ii)) de las moléculas de MHC de clase II como se describe en el presente documento pueden derivar y producirse por cualquier método apropiado, por ejemplo, por clonación o síntesis. Dichas secuencias podrían prepararse, por ejemplo, clonando secuencias apropiadas de fuentes apropiadas, por ejemplo de células tales como leucocitos aislados de capas leucocíticas convencionales, técnicas de PCR tales como RT-PCR convencional, pueden usarse para clonar secuencias apropiadas usando cebadores apropiados diseñados usando las secuencias del alelo del MHC de clase II particular de interés, que están disponibles en GenBank, pero a los que se puede acceder más fácilmente mediante la base de datos de IMGT. También podría llevarse a cabo síntesis génica completa, especialmente para expresión procariota ya que esto permitiría la optimización de codones que puede ser importante para maximizar el rendimiento.

55 Una vez que las secuencias iniciales se clonan o sintetizan, después puede realizarse cualquier modificación necesaria a las secuencias para obtener moléculas de ácido nucleico que codifican los restos de cisteína mutados

de la invención usando métodos bien conocidos y descritos en la técnica, por ejemplo mediante mutagénesis dirigida.

5 Además, si se desea o es necesario, pueden manipularse otras partes de las cadenas alfa y/o P de las moléculas de MHC de clase II para producir las moléculas de la invención. Por lo tanto, por ejemplo, los nucleótidos que codifican los dominios transmembrana y citoplasmático pueden retirarse, así como cualquier otra región que se considere innecesaria para que las moléculas de la invención sean funcionales.

10 Una vez que se han obtenido fragmentos de ácido nucleico que codifican las dos cadenas de las moléculas de MHC de clase II de la invención, estos fragmentos pueden manipularse adicionalmente por técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo para incluir otros componentes deseados, secuencias reguladoras, etc., o para incorporar los restos de cisteína no nativos o para retirar restos de cisteína nativos como se describe en otra parte del presente documento. Típicamente, o como parte de este procedimiento de manipulación adicional, los fragmentos de ácido nucleico que codifican las moléculas de MHC de clase II de la invención se incorporan en uno o más vectores de expresión apropiados y dicho vector o dichos vectores se incorporan en una célula hospedadora para facilitar la producción de las moléculas de MHC de clase II de la invención. Dichos vectores de expresión y células hospedadoras que contienen dichos vectores de expresión forman más aspectos adicionales de la invención.

20 Por lo tanto, un aspecto adicional más proporciona una construcción de expresión o un vector de expresión que comprende una o más de las moléculas de ácido nucleico de la invención. Preferentemente las construcciones o vectores de expresión son recombinantes. Preferentemente dichas construcciones o vectores comprenden además las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia proteica codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención.

25 Un aspecto adicional más proporciona una célula hospedadora que comprende una o más construcciones de expresión o vectores de expresión de la invención. También se proporcionan células hospedadoras que comprenden una o más de las moléculas de ácido nucleico de la invención. Una célula hospedadora que expresa una molécula de MHC de clase II de la invención forma un aspecto adicional más.

30 Un aspecto adicional más de la invención proporciona un método para producir una molécula de MHC de clase II de la presente invención, por ejemplo que comprende una etapa de cultivar las células hospedadoras de la invención. Los métodos preferidos comprenden las etapas de (i) cultivar una célula hospedadora que comprende uno o más de los vectores de expresión recombinantes o una o más de las secuencias de ácido nucleico de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de las cadenas α y β codificadas de las moléculas de MHC de clase II; y
35 opcionalmente (ii) aislar y obtener la proteína de la célula hospedadora o del medio de cultivo/sobrenadante. Dichos métodos de producción también pueden comprender una etapa de purificación del producto proteico. Preferentemente, dichos métodos de producción se llevan a cabo en una célula hospedadora procariota, por ejemplo una bacteriana, tal como las descritas en otra parte en el presente documento.

40 Por lo tanto, un aspecto adicional más de la invención proporciona un método para producir una molécula de MHC de clase II recombinante, que comprende:

- (i) toda o parte de la parte extracelular de una cadena α del MHC de clase II;
- (ii) toda o parte de la parte extracelular de una cadena β del MHC de clase II;

45 en la que (i) y (ii) proporcionan un dominio de unión a péptido funcional y en la que (i) y (ii) están unidos por un enlace disulfuro entre restos de cisteína localizados en el dominio $\alpha 2$ de dicha cadena α y el dominio $\beta 2$ de dicha cadena β , en la que dichos restos de cisteína no están presentes en dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ del MHC de clase II nativos, comprendiendo dicho método expresar dicha molécula recombinante en un hospedador procariota, preferentemente uno bacteriano.

50 Como se ha analizado anteriormente, el hecho de que puedan usarse células hospedadoras procariotas para producir moléculas de MHC de clase II funcionales de la invención que incorporen enlaces disulfuro es sorprendente y ventajoso.

55 Como las moléculas de MHC de clase II de la invención están compuestas de más de una cadena polipeptídica (es decir son heterodímeros), entonces en algunas realizaciones, por ejemplo, para realizaciones que implican presentación en fagos, la expresión periplásmica bacteriana y expresión eucariota, entonces todos los polipéptidos se expresan preferentemente en la misma célula hospedadora, bien a partir del mismo vector de expresión o de un vector de expresión diferente, de modo que las proteínas diméricas completas pueden ensamblarse en la célula hospedadora y aislarse o purificarse a partir de la misma. Para otras realizaciones tales como producción a granel en bacterias por medio de producción de cuerpos de inclusión deliberada, cada cadena debe expresarse en células hospedadoras separadas (notablemente el mismo tipo/la misma cepa de células hospedadoras).

65 Puede usarse cualquier sistema de producción apropiado (por ejemplo pueden usarse sistemas tanto procariotas como eucariotas) y los vectores de expresión se seleccionan y diseñan en consecuencia para asegurar la

compatibilidad con la célula hospedadora usada. Por lo tanto, los vectores de expresión son “adecuados para transformación de una célula hospedadora”, lo que significa que los vectores de expresión contienen una o más moléculas de ácido nucleico de la invención y secuencias reguladoras seleccionadas basándose en las células hospedadoras para usar para expresión, que se unen operativamente con las moléculas de ácido nucleico. Se pretende que unido operativamente signifique que el ácido nucleico está ligado a secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión del ácido nucleico.

En realizaciones de la invención en las que las moléculas de MHC de clase II de la presente invención que no comprenden un motivo de cremallera de leucina están en un formato no soluble, por ejemplo presentado en la superficie de otra partícula biológica o membrana, o cuando las moléculas de MHC de clase II de la presente invención se presentan en la superficie de un fago filamentoso, puede usarse cualquier método descrito en la técnica apropiado. Por ejemplo, puede hacerse referencia a textos convencionales tales como “Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery” por Sachdev S. Sidhu, 1995, o “Phage Display: A Laboratory Manual” por Barbas *et al.*, 1994. Se describen métodos y sistemas ejemplares por ejemplo en el documento WO09/024591 o son como se muestra en los Ejemplos experimentales.

En general, se prefiere el uso de vectores fagémidos para los aspectos de presentación en fagos de la invención y estos requieren el uso de cepas auxiliares apropiadas que pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la materia. Muchas cepas de fagos auxiliares apropiadas están disponibles en el mercado tales como por ejemplo fago auxiliar VCSM13 (Stratagene) y Hyper-Phage™ (Progen Biotechnik GmbH) y puede usarse convenientemente cualquiera de estos. Convenientemente se incorpora una cadena del heterodímero del MHC de clase II, es decir la cadena α o la cadena β , en el vector como una fusión con la proteína de cubierta elegida, por ejemplo gpIII o una de las otras proteínas de cubierta como se analiza en otra parte en el presente documento, mientras que la otra cadena se produce como una molécula soluble, es decir no como una fusión con una proteína de cubierta. La fusión con una proteína de cubierta se lleva a cabo generalmente en el extremo N terminal de dicha proteína de cubierta. En los Ejemplos adjuntos, la cadena β se produce como una fusión con la proteína de cubierta y la cadena α se produce de una forma soluble.

Otros componentes apropiados también pueden estar presentes en las construcciones/vectores fagémidos, muchos de los cuales son convencionales en dichos vectores. Por ejemplo, se incorporan en general secuencias señal tales como pelB para dirigir las proteínas al espacio periplásmico, junto con por ejemplo secuencias promotoras/operadoras apropiadas, sitios de unión a ribosomas, orígenes de replicación, terminadores de la transcripción, etc. Se muestra un vector fagémido ejemplar y componentes en la Figura 2 y uno o más de estos componentes pueden incorporarse en los vectores de expresión de la presente invención.

En realizaciones de la invención en las que va a proporcionarse un péptido para la unión con el dominio de unión a péptido de la molécula de MHC de clase II recombinante entonces estos pueden incorporarse convenientemente en las construcciones/vectores de expresión en una posición apropiada. En general estos se producen como fusiones covalentes con la cadena α o β , por ejemplo con el extremo N terminal de la cadena β , por medio de un péptido enlazador, ejemplos de los cuales se describen en otra parte en el presente documento.

En realizaciones de la invención en las que las moléculas de MHC de clase II están en un formato soluble y no comprenden un motivo de cremallera de leucina, dichas moléculas pueden obtenerse por expresión como cuerpos de inclusión en una célula hospedadora bacteriana tal como *E. coli*, y replegamiento posterior *in vitro*. Dicho replegamiento *in vitro* puede tener lugar en condiciones de replegamiento adecuadas usando protocolos convencionales (por ejemplo como se describe en Qoronfleh *et al.*, 2007, Protein Expression and Purification 55: 209-224) y modificaciones apropiadas de los mismos.

Como alternativa, pueden obtenerse moléculas de MHC de clase II solubles de la invención que no comprenden un motivo de cremallera de leucina mediante expresión en una célula hospedadora bacteriana tal como *E. coli*, en las que dichas moléculas se producen en el periplasma de dichos hospedadores. Puede conseguirse producción en el periplasma mediante el uso de un vector de expresión apropiado, por ejemplo incorporando un péptido señal tal como pe1B que dirige la proteína al espacio periplásmico.

La producción de las moléculas de MHC de clase II de la invención en un hospedador procariota, en particular un hospedador bacteriano, es una realización preferida de la invención. Dichos métodos de producción son compatibles con los formatos tanto de presentación en fagos como solubles del MHC de clase II descritos en el presente documento y pueden usarse para proporcionar grandes cantidades de proteína altamente purificada. Se prefiere en particular producción como moléculas solubles a partir de cuerpos de inclusión para obtener grandes cantidades de proteína altamente purificada. Las moléculas de MHC de clase II recombinantes de la invención, que tienen estabilidad aumentada por la inclusión de enlaces disulfuro modificados técnicamente, son particularmente adecuadas para producción de cuerpos de inclusión de alto rendimiento y preferentemente permiten una producción de mayor rendimiento de moléculas de MHC de clase II funcionales a partir de cuerpos de inclusión que la que puede conseguirse en la actualidad (son bastantes normales en la actualidad rendimientos en el intervalo de menos de 10 % del material de partida).

Puede usarse para dicha producción cualquiera hospedador procariota o bacteriano apropiado. Serían células hospedadoras preferidas células hospedadoras Gram negativas, más preferentemente *E. coli*. Los expertos en la materia conocerían bien hospedadores de *E. coli* apropiados para formatos de presentación en fagos e incluirían por ejemplo XL1-blue. Son hospedadores de *E. coli* preferidos para la producción de formatos solubles, en particular, en lo que se refiere a purificación a partir de cuerpos de inclusión, derivados de *E. coli* K12, más preferentemente los que tienen el fenotipo BL21 y derivados de los mismos (TERPE, K., Appl Microbiol Biotechnol., sep 2006; 72 (2): 211-22).

Un experto en la materia conocería bien hospedadores bacterianos apropiados para expresión periplásmica soluble (véase por ejemplo la revisión de Terpe, K., Appl Microbiol Biotechnol sep 2006; 72 (2): 211-22).

Como alternativa, pueden obtenerse moléculas de MHC de clase II solubles de la invención que no comprenden un motivo de cremallera de leucina mediante expresión en un sistema de células eucariotas, tal como células de levadura (incluyendo *Pichia*), mamífero o insecto. Un experto en la materia conocería bien células hospedadoras apropiadas para dichas técnicas de producción. Una realización preferida de la invención usando células hospedadoras eucariotas es producir las moléculas de MHC de clase II recombinantes de la invención como una fusión con una parte Fc de una inmunoglobulina (Ig), es decir como una fusión de Ig, por ejemplo como se describe en Casares *et al.*, 1997, mencionado anteriormente. En dichas realizaciones, una parte Fc de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo la parte Fc de una molécula IgG2a, puede fusionarse con la cadena α o la cadena β de MHC II (típicamente con el extremo C terminal de la cadena β) y usarse para conseguir dimerización de las cadenas α y β de las moléculas de MHC de clase II recombinantes de la invención (es decir moléculas que contienen los enlaces disulfuro artificiales de la invención). Dichas moléculas pueden expresarse en un sistema de células de insecto (u otro sistema apropiado), por ejemplo infectando células de insecto con baculovirus, de modo que pueden producirse moléculas de MHC de clase II estabilizadas por enlaces disulfuro secretadas.

Las secuencias reguladoras adecuadas para uso en los vectores de expresión de la invención pueden derivar de una diversidad de fuentes, incluyendo genes bacterianos, fúngicos, virales, de mamífero o de insecto (por ejemplo, véase las secuencias reguladoras descritas en Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990). La selección de secuencias reguladoras apropiadas depende de la célula hospedadora seleccionada, y puede conseguirse fácilmente por un experto en la materia. Los ejemplos de dichas secuencias reguladoras incluyen: un promotor transcripcional y potenciador o secuencia de unión a ARN polimerasa, una secuencia de unión ribosómica, incluyendo una señal de inicio de la traducción. Adicionalmente, dependiendo de la célula hospedadora seleccionada y el vector empleado, pueden incorporarse otras secuencias, tales como un origen de replicación, sitios de restricción de ADN adicionales, potenciadores y secuencias que confieren inducibilidad de la transcripción, en el vector de expresión.

Los vectores de expresión de la invención también pueden contener un gen marcador seleccionable que facilita la selección de células hospedadoras transformadas o transfectadas con una molécula recombinante de la invención. Son ejemplos de genes marcadores seleccionables genes que codifican una proteína tal como neomicina e higromicina que confieren resistencia a ciertos fármacos, β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa, luciferasa de luciérnaga o una inmunoglobulina o parte de la misma tal como la parte Fc de una inmunoglobulina preferentemente IgG. Se apreciará que pueden introducirse marcadores seleccionables en un vector separado del ácido nucleico de interés.

Los vectores de expresión recombinantes también pueden contener genes que codifican un resto de fusión que proporciona expresión aumentada de la proteína recombinante; solubilidad aumentada de la proteína recombinante; y ayuda en la purificación de la proteína recombinante diana actuando como un ligando en purificación de afinidad (por ejemplo pueden estar presentes "marcadores" apropiados para permitir la purificación y/o identificación, por ejemplo, marcadores His, marcadores HA, marcadores FLAG o marcadores myc). Por ejemplo, puede añadirse un sitio de escisión proteolítica a la proteína recombinante diana para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión después de purificación de la proteína de fusión. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia), pMal (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E o proteína A, respectivamente, con la proteína recombinante.

Otros componentes opcionales de los vectores de expresión incluyen secuencias de biotilación (en particular para realizaciones que implican formatos multiméricos) tales como AviTag u otro sustrato de BirA, marcadores para detección, por ejemplo marcadores fluorescentes para permitir llevar a cabo técnicas de citometría de flujo.

Pueden introducirse vectores de expresión en células hospedadoras para producir una célula hospedadora transformada. Se pretende que las expresiones "transformada con", "transfectada con", "transformación" y "transfección" abarquen la introducción de ácido nucleico (por ejemplo, un vector) en una célula por una de muchas posibles técnicas conocidas en este campo. Se entiende que la expresión "célula hospedadora transformada" como se usa en el presente documento también incluye células con capacidad de glucosilación que se han transformado con un vector de expresión recombinante de la invención. Pueden transformarse células procariotas con ácido nucleico mediante, por ejemplo, electroporación o transformación mediada por cloruro cálcico. Por ejemplo, puede

introducirse ácido nucleico en células de mamífero mediante técnicas convencionales tales como fosfato cálcico o co-precipitación con cloruro cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, electroporación o microinyección. Pueden encontrarse métodos adecuados para transformar y transfectar células hospedadoras en Sambrook *et al.*, 1989 y otros libros de texto de laboratorio. Para aspectos de la invención que implican presentación en fagos, puede hacerse referencia a libros de texto de presentación en fagos de propósito general tales como “Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery” por Sachdev S. Sidhu, 1995, o “Phage Display: A Laboratory Manual” por Barbas *et al.*, 1994 para técnicas relevantes.

Pueden prepararse proteínas de fusión N terminales o C terminales que comprenden las proteínas de la invención conjugadas con otras moléculas fusionando mediante técnicas recombinantes. Las proteínas de fusión resultantes contienen una proteína de la invención fusionada con una proteína seleccionada adicional, por ejemplo una proteína marcadora o proteína de etiqueta como se describe en el presente documento. Las proteínas de la invención también pueden conjugarse con otras proteínas por otras técnicas conocidas. Por ejemplo, las proteínas pueden acoplarse usando enlaces que contienen tiol heterobifuncionales como se describe en el documento WO 90/10457, N-succinimidil-3-(2-piridilditio-propionato) o N-succinimidil-5 tioacetato. Los ejemplos de proteínas que pueden usarse para preparar proteínas de fusión o conjugados incluyen proteínas de unión a células tales como inmunoglobulinas, hormonas, factores de crecimiento, lectinas, insulina, lipoproteína de baja densidad, glucagón, endorfinas, transferrina, bombesina, asialoglicoproteína glutatión-S-transferasa (GST), hemaglutinina (HA) y myc truncado.

Independientemente del modo de preparación de moléculas de ácido nucleico que codifican una primera molécula de MHC de clase II de la invención, pueden prepararse fácilmente moléculas de ácido nucleico variantes adecuadas adicionales mediante técnicas biológicas moleculares convencionales. Para confirmar que cualquier variante, mutante o molécula de ácido nucleico de segunda generación que codifica una molécula de MHC de clase II de la invención es adecuado para su uso en la presente invención, la molécula de ácido nucleico se ensayará para confirmar la funcionalidad como se describe en otra parte en el presente documento. Preferentemente, el segmento de ácido nucleico variante, mutante o de segunda generación, también se ensayará para confirmar la hibridación en condiciones de hibridación convencionales, más preferentemente, rigurosas convencionales. Las condiciones de hibridación adecuadas ejemplares incluyen hibridación en dodecil sulfato sódico (SDS) aproximadamente 7 %, NaPO₄ aproximadamente 0,5 M, EDTA aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 °C; y lavado con SDS aproximadamente 1 % a aproximadamente 42 °C.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un” y “el” incluyen referencia plural a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa.

La invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes con referencia a los siguientes dibujos en los que:

La Figura 1 muestra la modelación por ordenador de enlaces disulfuro potenciales que conectan los dominios α 2- β 2 de la molécula de MHC de clase II murina I-E^K (PDB: 1FNG). Se muestran tanto los restos wt (*de tipo silvestre*) (panel superior) como los mutantes correspondientes (panel inferior) de los tres pares de aa de mayor clasificación en la Tabla 2: rango 1 (A), rango 2 (B) y rango 3 (C) incluyendo las distancias atómicas relevantes.

La Figura 2 muestra la cadena principal de vector del fagémido pFABDFN que se basa en el fagémido de presentación de pIII pSEX81 (número de referencia de GenBank: Y14584). El fagémido puede alojar segmentos de secuencias exógenas en fase, (denominadas E₁ y E₂) mediante intercambio de casete de las partes *NcoI/Spel* y *MluI/SfiI* respectivamente. La cadena α I-E^d (aa 26-204) y cadenas β (aa27 – 216) se insertaron en E₁ y E₂, respectivamente. Abreviaturas: lacPO, promotor lac; sd, secuencia de Shine-Dalgarno; pelB, secuencia señal de pectato liasa bacteriana; t, terminador de la transcripción T7; xPO, promotor nativo de *fkpA*; FkpA, fase abierta de lectura de *fkpA*, f1 IG, región intergénica del fago f1; AmpR; región codificante de β -lactamasa; ColE1, origen de replicación.

La Figura 3 muestra múltiples alineamientos de secuencia por ClustalW2.02 que comparan las secuencias de cadena α (A) y β (B) de referencia de IMGT de la molécula de MHC de clase II murina I-E e I-A con las de las I-E^d (marcada_EL) e I-E^K (marcada 1FNG) clonadas. Las posiciones elegidas para sustituciones de cisteína se destacan en sombreado negro (numeradas de acuerdo con la Tabla 2/sec. de I-E IMGT madura): rango 1 (α 96- β 118/ α 96- β 119), rango 2 (α 95- β 120/ α 95- β 121) y rango 3 (α 94- β 150/ α 94- β 151). Se muestra la secuencia de IMGT de longitud completa de la cadena α (H-2EA*02) y en ocasiones se denomina en el presente documento SEQ ID NO: 1. Se muestra la secuencia de IMGT de longitud completa de la cadena β (H-2EB1*01) y se denomina en ocasiones en el presente documento SEQ ID NO: 2. La secuencia de IMGT madura de la cadena α , es decir, la secuencia de longitud completa que excluye el péptido señal, se denomina en ocasiones en el presente documento SEQ ID NO: 3 (H-2EA*02 que excluye el péptido señal). La secuencia de IMGT madura de la cadena β , es decir, la secuencia de longitud completa que excluye el péptido señal, se denomina en ocasiones en el presente documento SEQ ID NO: 4 (H-2EB*11 que excluye el péptido señal). La anotación sobre cada secuencia se realiza en referencia a PDB ID: 1FNG y Burrows *et al.*, 1999, Protein Engineering, 12: 771-778.

La Figura 4 muestra análisis de la integridad de I-E^d-pIII por ELISA de fagos. Los anticuerpos en cuestión se inmovilizaron y se permitió que reaccionaran cantidades normalizadas de viriones. Se detectaron viriones capturados con un conjugado anti-M13^{HRP} y el ELISA se desarrolló con lectura de TMB a A_{450nm}. Se incluyó como control un anticuerpo presentado en Fab específico de phOx-BSA.

5 La Figura 5 muestra análisis de presentación de I-E^d-pIII multivalente por SDS PAGE/transferencia de western desarrollado con anti-pIII. Numeración de restos de acuerdo con PDB ID: 1FNG (véase Tabla 2).

10 La Figura 6a muestra que los fagos que presentan I-E^d estabilizado por P96C^{α2}-S119C^{β2} (rango 1, Tabla 2) tiñen específicamente células de hibridoma de linfocitos T LD1. Las células LD1 se bloquean y se tiñen con fagémidos que presentan I-E^d-pIII durante 2 horas en hielo seguido de incubaciones con conjugado de biotina anti fd de conejo biotinilado y estreptavidina PE.

15 La línea continua representa presentación de HA^{aa110-120}/I-E^d-pIII y la línea discontinua representa presentación de I-E^d-pIII. Notablemente, se consigue tinción específica incluso a un título muy bajo (5×10^9 fagos/ml), mientras que el título máximo que puede conseguirse es $\sim 10^{13}$ fagos/ml.

20 La Figura 6b muestra que los fagos que presentan I-E^d estabilizado por R94C^{α2}-N151C^{β2} (rango 3, Tabla 2), S95C^{α2}-S121C^{β2} (rango 2, Tabla 2) o P96C^{α2}-S119C^{β2} (rango 1, Tabla 2) tiñen específicamente células de hibridoma de linfocitos T LD1. Las células LD1 se tiñeron con fagémidos que presentaban I-E^d-pIII durante 30 minutos a TA seguido de incubaciones con conjugado de biotina anti-fd de conejo biotinilado y APC con estreptavidina. La Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) para cada preparación de fagos se representa como gráficos de barras. Notablemente, se consigue tinción específica incluso a un título muy bajo (2×10^9 fagos/ml), mientras que el título máximo que puede conseguirse es $\sim 10^{13}$ fagos/ml.

25 La Figura 7 muestra múltiples alineamientos de secuencias por ClustalW2.02 de las secuencias de alotipos de MHC de clase II murinos y humanos representativos de IMGT I-E, I-A, HLA-DP, -DQ y -DR. El alineamiento de cadenas α se muestra en A y el alineamiento de cadenas β se muestra en B, respectivamente. Las posiciones identificadas para sustituciones de cisteína como se muestra en la Tabla 2, Figura 1 y Figura 3, se destaca en sombreado en negro. Las posiciones identificadas se localizan todas en los dominios $\alpha 2/\beta 2$ conservados.

30 La Figura 8 muestra que superponiendo 8 estructuras de HLA de clase II humanas diferentes se muestra que la estructura cuaternaria está altamente conservada a pesar de polimorfismo genético extensivo; validando por lo tanto los alineamientos en la Fig. 7 en el ámbito estructural (Fig. 8A). Centrándose en, por ejemplo, el par de restos R94^{α2}-N150^{β2} (rango 3, Tabla 2) en las estructuras superpuestas globalmente en A, se revela un posicionamiento altamente conservado con una variación de RMSD global de 0,29 a 1,18 Å (Fig. 8B). Estas estructuras pueden considerarse por lo tanto prácticamente idénticas en el ámbito topológico ya que las diferencias observadas están únicamente dentro de la variación experimental esperada para estructuras independientes de una única molécula.

35 La Figura 9 muestra que los fagos que presentan HLA-DR o HLA-DQ2.5 estabilizado por S95C^{α2}-S121C^{β2} (rango 2, Tabla 2) tiñen específicamente clones de linfocitos T humanos. Se bloquearon células T18, TCC 820.26, y TCC 820.88 y se tiñeron con fagémidos que presentan HLA de clase II-pIII durante 1 hora a TA seguido de incubaciones en hielo con conjugado de biotina anti-fd de conejo biotinilado y estreptavidina-PE. Se representa la Intensidad Media Geométrica (IMG) para cada preparación de fago como gráficos de barras.

45 La Figura 10 muestra análisis de los niveles de presentación de I-E^d-pIII monovalentes (M13K07) y multivalentes (HyperPhage) por SDS PAGE no reductor o reductor seguido de transferencia de western detectado con anti-pIII. Numeración de restos de acuerdo con IMGT (véase Tabla 2).

50 Ejemplos

Ejemplo 1

MATERIALES Y MÉTODOS

55 *Evaluación estructural, modelación molecular y análisis de secuencia*

Se usó la estructura cristalina de resolución de 1,9 Å (PDB ID: 1FNG) de la molécula de MHC de clase II murino I-E^k en complejo con péptido derivado de Hemoglobina (Hb) (Hb^{aa65-76})¹ para predicciones de enlace disulfuro iniciales. Se examinaron los restos que forman interfaz entre los dominios constantes $\alpha 2$ - $\beta 2$ y las cadenas laterales cuyos carbonos β estaban a una distancia menor de 7 Å se seleccionaron para análisis adicional. En primer lugar, las cadenas laterales seleccionadas se cambiaron a cisteínas por mutagénesis por ordenador de modo que los rotámeros óptimos se seleccionaron por una exploración de bibliotecas de rotámeros. En casos en los que los grupos tiol del par de restos seleccionado estaban en posición subóptima para la formación de enlaces disulfuro, el ángulo dihédrico $\chi 1$ de las cadenas laterales se rotó manualmente hasta una posición favorable. Después se

optimizaron las geometrías locales por una minimización de energía restringida usando el campo de fuerza Gromos96.

Las secuencias de referencia de IMGT murino traducidas para H-2E (número de referencia de GenBank: K00971 y AF050157) y H-2A número de referencia de GenBank: V00832 y M13538), el H-2E^d clonado de los inventores (véase posteriormente) y las secuencias de PDB: 1FNG H-2E se alinearon con ClustalW2.02 (<http://www.ebi.ac.uk/>) y se anotaron manualmente. Los H-2A y E murinos representativos, así como HLA-DP, DQ y DR humanos se descargaron de IMGT (http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoireMHC/LocusGenes/RepresentativeMHCg_c.html) se tradujeron y se alinearon con ClustalW2.02 (<http://www.ebi.ac.uk/>). Las secuencias de referencia de IMGT usadas fueron (códigos de referencia de GenBank de cadena α /cadena β): I-A (V00832/ M13538), I-E (K00971/AF050157), HLA-DP (X03100/M23907), HLA-DQ (M23907/U92032) y HLA-DR (J00204/AJ297583). El alineamiento se sombrió manualmente de acuerdo con H-2E y el análisis estructural de PDB: 1FNG. Este alineamiento de secuencias se validó por alineamiento estructural y superposición estructural simultánea de entradas de PDB representativas: 1FNG (I-E^k), 1S9V (HLA-DQ2), 1JK8 (HLA-DQ8), 1DLH (HLA-DR1), 1BX2 (HLA-DR2), 1HQR (HLA-DR2a), 1A6A (HLA-DR3), 1D6E (HLA-DR4) y 2Q6W (HLA-DR52a). Se usó el software de visualización de spdb 3.7SP5² para todas las operaciones de visualización y manipulación moleculares.

Cepas bacterianas, fagos auxiliares y plásmidos

La cepa de *E. coli* XL1-Blue y el fago auxiliar VSCM13 se obtuvieron de Stratagene (LaJolla, CA, Estados Unidos). Se obtuvieron fagos auxiliares HyperPhageTM de Progen Biotechnik GmbH (Heidelberg, Alemania). El fagémido de presentación de pIII pSEX81³ que albergaba un Fv monocatenario (scFv) con especificidad contra pOx-BSA se proporcionó amablemente por Affitech AS (Oslo, Noruega) y está disponible también a través de Progen Biotechnik GmbH (Heidelberg, Alemania). Los fagémidos pFABDFN y de presentación en pFAB basado en pSEX81 que albergan la especificidad de pOx-BSA se han descrito previamente⁴.

Líneas celulares

El hibridoma de linfocitos T LD1⁵ es específico para un péptido derivado de hemaglutinina de gripe (aminoácidos 110-120; N-SFERFEIFPKC-C) cuando se presenta en la molécula de MHC de clase II murino I-E^d. El clon de linfocitos T CD4⁺ humano T18 es específico para Ig C kappa de ratón (aminoácidos 40-48; N-WKIDGSRQ-C) y se restringe por HLA-DR4 (DRA1,B1*0401) (PMID: 12456590). Los clones de linfocitos T humanos, TCC 820.26 y TCC 820.88, reconocen el epítipo de DQ2- α I (aminoácidos 57-68; N-QLQFPQPPELPY-C) y epítipo DQ2- α II (aminoácidos 62-72; N-PQPELPYPQPE-C), respectivamente. Las células se proporcionaron amablemente por Dr. S.-W. Qiao (Instituto de Inmunología, Universidad de Oslo, Oslo, Noruega). Todas las células se mantuvieron en RPMI 1640 complementado con FCS 10 %, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, Piruvato Sódico 1 mM, monoglicérol 50 μ M y sulfato de gentamicina 12 μ g/ml.

Ab y reactivos adicionales

Todos los medios y tampones se prepararon esencialmente como se describe en Sambrook *et al*⁶. Los anticuerpos de ratón anti-pIII, de conejo anti-fd, de conejo anti-fd conjugado con biotina, de oveja anti-M13-HRP y de oveja anti-HRP de ratón se obtuvieron de MoBiTec (Goettingen, Alemania), Sigma-Aldrich (Oslo, Noruega) y Amersham Biosciences (Uppsala, Suecia), respectivamente. El anticuerpo anti-I-E/I-A 2G9 y los conjugados de estreptavidina-PE y estreptavidina-APC se obtuvieron de BD Pharmingen (San Jose, CA, Estados Unidos). El anticuerpo de rata anti-CD32 de ratón 2.4G2 (número de ATCC[®] HB-197TM) se produjo de forma interna. El hapteno 2-feniloxazol-5-ona (pOx) conjugado con albúmina de suero bovino (BSA) se preparó esencialmente como se ha descrito⁷. Se obtuvieron enzimas de restricción (ER) de New England Biolabs (Ipswich, MA, Estados Unidos) con la excepción de DpnI, que se obtuvo de Stratagene (LaJolla, CA, Estados Unidos). Se obtuvieron oligos de ADN de MWG Biotech AG (Ebersberg, Alemania), DNA Technology (Aarhus, Dinamarca), o Sigma-Aldrich. Se obtuvieron BSA y Tween 20 de Sigma-Aldrich (Oslo, Noruega). Se obtuvo ADN polimerasa Pfu Turbo de Stratagene (LaJolla, CA, Estados Unidos). Se obtuvo tripsina/EDTA de BioWhittaker (Lonza Group Ltd., Visp, Suiza).

Construcción de un fagémido de presentación de I-E^d-pIII

Se recuperaron los genes de H-2E de células de linfoma B A20 BALB/c por RT-PCR y se clonaron por separado en el vector pLNOH2 eucariota, creando fusiones de I-E^d-Ig esencialmente como se describe en Casares *et al*⁸. Los genes que codificaban I-E^d α e I-E^d β se amplificaron a partir de estos vectores usando los siguientes pares de cebadores: pFAB I-Eda dir (5'-TATACCATGGCCATCAAAGAGGAACACACCCATCATCCAGG-3') y pFAB I-Eda inv (5'-TATAACTAGTCATTACTCCAGTGCTTCCGCAGAG-3') para I-E^d α , y pFAB I-Edb dir (5'-TATAACGCGTCAGAGACACCAGACCACGGTTTTTG-3') y pFAB I-Edb inv (5'-TATAGGCCGCAGCGGCCCTTTCCACTCGACCGTGACAGGGT-3') para I-E^d β . Los genes de I-E^d se clonaron en el fagémido pFABDFN de modo que el gen I-E^d β se fusionó con la proteína de superficie M 13 pIII mientras que la cadena α de I-E^d se produciría como una entidad soluble (Fig. 2). Se insertó ADN que codificaba un péptido derivado de hemaglutinina de gripe (aa 110-120) y un enlazador de 15 aa (G₄S)₃ en el extremo N terminal de la cadena β de I-

E^d usando corte y empalme de genes por extensión solapante como se ha descrito⁹ y los siguientes cebadores: pMHCHA SOEing dir (5'-AAAGGAAGGAGGTGGTGGCTCCGGTGGAGGGGGAAGTGGAGGTGGAGGGTCTGTCAGAGACACCAGACCACG GTT-3') y pMHCHA SOEing inv (5'-GGAGCCACCACCTCCTTCTTTGGGAAGATCTCGAACCTTTTGAATGATA CGCGTGCCATCGCCG-3'). Para fines de clonación, se retiró un sitio de restricción PstI en el gen I-E^d β por mutagénesis dirigida QuikChange™ de acuerdo con el protocolo del fabricante (Stratagene, LaJolla, CA, Estados Unidos) usando los cebadores QCIEdbPstI dir (5'-TGGACACGTAAGTGTAGACACAACCTATGAGAT-3') y QCIEdbPstI inv (5'-ATCTCATAGTTGTGTCTACAGTACGTGTCCA-3'). Se introdujeron mutaciones puntuales para introducir enlaces disulfuro por mutagénesis dirigida QuikChange™ de acuerdo con el protocolo del fabricante (Stratagene, LaJolla, CA, Estados Unidos). Los cebadores usados fueron Mut R94C I-Ed alfa dir (5'-GACTGTACTCTCCTGTAGCCCTGTGAACC-3') y Mut R94C I-Ed alfa inv (5'-GGTTCACAGGGCTACAGGAGGTACAGTC-3') para mutación R94C en I-E^d α , Mut N151C I-Ed beta dir (5'-CCTGGTCCGATGTGGAGACTGGACCTTC-3') y Mut N151C I-Ed beta inv (5'-GAAGTCCAGTCTCCACATCGGACCAGG-3') para mutación N150C en I-E^d β , QCIEdaS95C dir (5'-ACTCTCCAGATGCCCTGTGAAC-3') y QCIEdaS95C inv (5'-GTTTCACAGGGCATCTGGAGAGT-3') para mutación S95C en I-E^d α , QCIEdbS120C dir (5'-GTCTGCTCTGTGTGTGACTTCTAC-3') y QCIEdbS120C inv (5'-GTAGAAGTCCACACAGAGCAGAC-3') para mutación S120C en I-E^d β , QCIEdaP96C dir (5'-CAGAAGCTGTGTGAACCTGGGA-3') y QCIEdaP96C inv (5'-TCCCAGGTTCCACACAGCTTCTG-3') para mutación P96C en I-E^d α , y QCIEdbS118C dir (5'-CCTGGTCTGCTGTGTGAGTGAC-3') y QCIEdbS118C inv (5'-GTCCTCACACAGCAGACCAGG-3') para mutación S118C en I-E^d β .

Preparación de bacteriófagos que presentan MHC II

Se supervisó el rescate de fagémido de *E. coli* XL1-Blue usando fagos auxiliares VSCM13 o HyperPhage™ y ensamblaje de viriones por titulación puntual como se ha descrito¹⁰.

ELISA de captura de fagos

Los Abs de captura y pHx-BSA se absorbieron en pocillos de placas de microtitulación MaxiSorp™ (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en concentraciones de 2,5 a 5 μ g/ml en PBS, pH 7,4 durante una noche a 4 °C. Los pocillos se bloquearon con PBSTM (PBS complementado con Tween 20 0,05 % v/v y leche desnatada 4 % p/v) durante 1 h a TA. Después se añadieron cantidades normalizadas de preparaciones de viriones (muestras rescatadas por VSCM13: 1×10^{10} ufc^{ampR}/pocillo; muestras rescatadas por HyperPhage: 1×10^8 ufc^{ampR}/pocillo) y se permitió que reaccionaran durante 1 a 2 h a TA antes de detectarse viriones capturados con anti-M 13-HRP (1:5.000) durante 1 h a TA. Los pocillos se desarrollaron con sustrato soluble TMB (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), se detuvieron con HCl 1 M después de 30 min y se leyó la absorbancia a A_{450nm}.

SDS-PAGE y transferencia de western

Se separaron viriones (10^8 ufc^{ampR}/carril) por SDS-PAGE premoldeado Criterion 4-12 % Bis/Tris XT no reductor y reductor (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (Millipore, Madison, Estados Unidos) en tampón de Tris/glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20 %, pH 8,3) a 25 V durante 30 min usando un aparato de transferencia semiseco (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos). La membrana se bloqueó en PBSTM antes de detectarse fusiones de pIII con MAb anti-pIII de ratón (1:4.000) seguido de anti-HRP de ratón de oveja (1:10.000). La membrana se lavó y se desarrolló con sustrato West Femto SuperSignal™ (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos) y se expuso a película MR BioMax™ (Kodak, Femwald, Alemania).

Construcción de HLA-DP, -DR y DQ que contiene enlaces S-S artificiales

Se sintetizaron químicamente genes que codificaban el HLA-DR (DRA*0101/ DRB1*1402) y -DQ (DQA1*0501/ DQB1*0301) representativos, como se define por IMGT (<http://imgt.cines.fr>) (Genscript, Piscataway, NJ). Las secuencias de ADN se optimizaron corrigiendo con respecto a la preferencia codónica de *E. coli* y se incorporaron mutaciones puntuales para introducir el par de cisteínas α 2- β 2 de rango 2 (Tabla 2). Los fragmentos de ADN se clonaron en el fagémido pFABDFN como se ha descrito anteriormente.

Como alternativa, se amplifican genes que codifican el HLA-DP(DPA 1*0103/DPB 1*0401), -DR (DRA*0101/DRB1*1402) y DQ (DQA1*0501/ DQB 1*0301), representativos, como se define por IMGT (<http://imgt.cines.fr>) por RT-PCR a partir de PBMC humanas recién aisladas y se clonan en el fagémido pFABDFB como se ha descrito anteriormente. Se incorporan mutaciones puntuales para introducir el par de cisteínas α 2- β 2 de rango 2 (Tabla 2) por mutagénesis dirigida QuikChange™ de acuerdo con el protocolo del fabricante (Stratagene, LaJolla, CA, Estados Unidos). Los cebadores usados (enumerados en la Tabla 1) son DPA_S95C_sentido y DPA_S95C_antisentido para la mutación S95C en el dominio α 2 de HLA-DPA, DPB_S121C_sentido y DPB_S121C_antisentido para la mutación S121C en el dominio β 2 de HLA-DPB, DRA_S95C_sentido y DRA_S95C_antisentido para la mutación S95C en el dominio α 2 de HLA-DRA, DRB_S121C_sentido y

DRB_S121C_antisentido para la mutación S121C en el dominio $\beta 2$ de HLA-DRB, DQA_S95C_sentido y DQA_S95C_antisentido para la mutación S95C en el dominio $\alpha 2$ de HLA-DQA, DQB_S121C_sentido y DQB_S121C_antisentido para la mutación S121C en el dominio $\beta 2$ de HLA-DQB.

Tabla 1.	
DPA_E95C_sentido	5'-GACCGTGTTCCTCCCAAGTGCCTGTGGAGCTGGGCC-3'
DPA_E95C_antisentido	5'-GGCCAGCTCCACAGGGCACTTGGGAAACACGGTC-3'
DRA_S95C_sentido	5'-CTGTGCTCACGAACIGCCCTGTGGAAGT-3'
DRA_S95C_antisentido	5'-CAGTTCACAGGGCAGTTCGTGAGCACAG-3'
DQA_S95C_sentido	5'-TGAGGTCACAGTGTTCCTCCCAAGTGCCTGTGGAGCTGGGCC-3'
DQA_S95C_antisentido	5'-CAGTGTACAGGGCACTTGGAAAACACTGTGACCTCA-3'
DPB_T121C_sentido	5'-TGCTTGTCTGCCACGTGTGCGATTTCTACCCAGGCAG-3'
DPB_T121C_antisentido	5'-CTGCCTGGGTAGAAATCGCACACGTGGCAGACAAGCA-3'
DRB_S121C_sentido	5'-TCCTGGTCTGTTCTGTGTGCGTTTCTATCCAGGCAG-3'
DRB_S121C_antisentido	5'-CTGCCTGGATAGAAACCGCACACAGAACAGACCAGGA-3'
DQB_T121C_sentido	5'-CTGCTGGTCTGCTCAGTGTGCGATTTCTATCCAGCCAG-3'
DQB_T121C_antisentido	5'-CTGGGCTGGATAGAAATCGCACACTGAGCAGACCAGCAG-3'

5

Citometría de flujo

Se bloquearon suspensiones de células individuales de células LD1 15 min en hielo con suero de rata inactivado por calor al 60 % y mAb anti-CD32 200 $\mu\text{g/ml}$ en PBS 1x (Figura 6a) o no se bloquearon (Figura 6b). Se realizó tinción de presentación de I-E^d-pIII empaquetado en HyperPhage en hielo durante 2 h en tampón de tinción (PBS 1x con BSA al 0,5%) (Figura 6a) o durante 30 min a TA en PBS 1x con BSA 1 % (Figura 6b). La aportación de fago usada en la Figura 6a fue de 5×10^9 ufc^{ampR} para presentación de HA^{aa110-120}-I-E^d y $1,6 \times 10^{10}$ ufc^{ampR} para presentación de I-E^d. La aportación de fagos en la Figura 6 fue 2×10^9 ufc^{ampR} para todas las preparaciones excepto fago auxiliar VCSM13 (control negativo, 1×10^{11} ufc^{kanR}/ml). Las muestras se incubaron después durante 1 hora (Figura 6a) o 30 min (Figura 6b) en hielo con anti-fd de conejo biotinilado 10 $\mu\text{g/ml}$ seguido de 15 min en hielo con estreptavidina PE 2 $\mu\text{g/ml}$.

Se prepararon suspensiones de células individuales en tampón de tinción (PBS 1x con BSA al 0,5%) de los tres clones de linfocitos T T18, TCC 820.26 o TCC 820.88, respectivamente. Las células se tiñeron a TA durante 1 h con fagos que presentaban de forma multivalente (empaquetados en HyperPhage) o monovalente (empaquetados en VCSM13) que presentaban fusiones de HLA de clase II-pIII (Figura 9). Las aportaciones de fagos usadas fueron de $\sim 1 \times 10^9$ ufc^{ampR} (Figura 9a), $\sim 2 \times 10^9$ ufc^{ampR} (Figura 9b), y aproximadamente $\sim 2 \times 10^{12}$ ufc^{ampR} (Figura 9c y 9d), respectivamente. Las muestras se incubaron después 1 hora en hielo con anti-fd de conejo biotinilado 10 $\mu\text{g/ml}$ seguido de 30 min en hielo con estreptavidina-PE 2 $\mu\text{g/ml}$. Se adquirieron acontecimientos en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) y se analizaron usando software CellQuest PRO (BD Biosciences).

RESULTADOS

Modelación molecular

La Tabla 2 (numeración 1FNG) muestra las distancias de cadenas laterales de carbono β para pares seleccionados de restos en la interfaz de dominio constante $\alpha 2/\beta 2$ en la estructura de I-E^{d α} /I-E^{k β} (PDB ID: 1FNG). De hecho, la mutagénesis por ordenador y optimización de cadenas laterales de los pares de restos de rango 1 a 3 a cisteínas produjo distancias de enlaces disulfuro entre 2,03 y 2,07 Å sin alterar la estructura terciaria de la proteína (Fig. 1). Este resultado indicó en fuerte medida que estas sustituciones de aminoácidos se permitirían y probablemente formarían enlaces disulfuro en los polipéptidos mutantes y por lo tanto se elegían para análisis adicional. Notablemente, la numeración de aa depositada con el PDB ID 1FNG se desvía de la numeración de secuencia de IMGT de la cadena β (véase Fig. 3B).

40

Tabla 2

Pares de aa $\alpha 2$ - $\beta 2$ dispuestos por distancia c β -c β			
Rango	Pares de aa		c β - c β
	Numeración de 1FNG*	Numeración de IMGT**	
1	Pro96 ^{$\alpha 2$} -Ser118 ^{$\beta 2$}	Pro96 ^{$\alpha 2$} -Ser119 ^{$\beta 2$}	5,49
2	Ser95 ^{$\alpha 2$} -Ser120 ^{$\beta 2$}	Ser95 ^{$\alpha 2$} -Ser121 ^{$\beta 2$}	5,51
3	Arg94 ^{$\alpha 2$} -Asn150 ^{$\beta 2$}	Arg94 ^{$\alpha 2$} -Asn151 ^{$\beta 2$}	5,57
4	Phe148 ^{$\alpha 2$} -Gly151 ^{$\beta 2$}	Phe148 ^{$\alpha 2$} -Gly152 ^{$\beta 2$}	5,71

Pares de aa $\alpha 2$ - $\beta 2$ dispuestos por distancia c β -c β			
Rango	Pares de aa		c β - c β
	Numeración de 1FNG*	Numeración de IMGT**	
5	Pro96 ^{$\alpha 2$} -Thr100 ^{$\beta 2$}	Pro96 ^{$\alpha 2$} -Thr101 ^{$\beta 2$}	6,11
6	Pro96 ^{$\alpha 2$} -Ser120 ^{$\beta 2$}	Pro96 ^{$\alpha 2$} -Ser121 ^{$\beta 2$}	6,16
7	Ile106 ^{$\alpha 2$} -Asn150 ^{$\beta 2$}	Ile106 ^{$\alpha 2$} -Asn151 ^{$\beta 2$}	6,16
8	Ser95 ^{$\alpha 2$} -Asp121 ^{$\beta 2$}	Ser95 ^{$\alpha 2$} -Asp122 ^{$\beta 2$}	6,30

* numeración de aa de acuerdo con PDB ID: 1FNG.
** numeración de aa de acuerdo con las secuencias de referencia de IMGT maduro H-2EA*02 y H-2EB1*01.

Diseño de las fusiones de MHC-pIII

Los segmentos génicos de I-E^d se insertaron en el fagémido pFABDFN de modo que las cadenas α y β se tradujeron como dos polipéptidos separados y de las que la cadena β se fusionó directamente en fase con el extremo N terminal de la proteína de cápsida viral pIII (Fig. 2). Ambas cadenas contenían una secuencia señal N terminal (peIB) para dirección periplásmica. La parte de cadena α insertada (Fig. 3A, H-2EA_EL) corresponde a los aminoácidos 26 – 204 de la secuencia de referencia de IMGT H-2EA*02 (código de referencia de GenBank: K00971, SEQ ID NO: 1) mostrada en la Figura 3A. De forma similar, la parte de cadena β correspondiente a los aminoácidos 27 – 216 de la secuencia de referencia de IMGT H-2EB1*01 (código de referencia de GenBank: AF050157, SEQ ID NO: 2) mostrada en la Figura 3B se utilizó (Fig. 3B, H-2EB_EL). Por lo tanto, las posiciones para las sustituciones de cisteína de rango 1 a 3 en la Tabla 2 corresponden a las posiciones de cadena α 94 – 96 (Fig. 3A) y las posiciones de cadena β 119, 121 y 151 (Fig. 3B) de los péptidos maduros (es decir, los péptidos sin los péptidos señal), respectivamente, basándose en las secuencias de referencia de I-E IMGT. Notablemente, esta numeración de restos de cadena β se desvía de la depositada con el archivo de plantilla de 1FNG.

Análisis de presentación de MHC II-pIII derivado de fagémido

Para comparar la propensión de presentación e integridad de los restos de pMHC, se realizó un ELISA de fagos capturando cantidades normalizadas de viriones en un anticuerpo monoclonal específico de I-E (MAb), 2G9. Los resultados mostraron que todas las muestras se reconocían por MAb 2G9 en presentación de valencia tanto alta como baja (Fig. 4), lo que indica una integridad estructural general conservada. MAb 2G9 se une con la cadena β de I-E, que se fusionó directamente con pIII. Para evaluar si estaba presente cualquier heterodimerización de cadena α covalente en los fagos, se analizó una cantidad normal de viriones por SDS PAGE reductor y no reductor seguido de detección de transferencia de western anti-pIII. Los resultados mostraron que una proporción significativa de heterodímeros covalentes estaban en todas las muestras, con dos excepciones, el wt (*tipo silvestre*) (Fig. 5, carril 5) y el mutante $\alpha 95/\beta 120$ que portaba el péptido HA (Fig. 5, carril 3). Sin embargo, esta última muestra mostró inesperadamente una carga de muestras muy baja que obstaculizaba una resolución apropiada. Tras la reducción de las muestras se anuló toda la formación de complejo covalente (Fig. 5, carriles 11-20). Además, como para el control de Fab de anticuerpo (Fig. 5 carriles 10 y 20), solamente se esperaba una especie heterodimérica covalente para los restos de pMHC modificados. Claramente, este no fue el caso, ya que se observaron múltiples especies tales en todas las muestras relevantes. Este fenómeno se explica más probablemente por formación de enlaces disulfuro aberrantes entre restos de cisteína nativos así como las mutaciones introducidas. Por lo tanto, solamente se encuentra una fracción de la proteína de hecho presentada como cadenas que albergan los enlaces disulfuro nativos además de los enlaces introducidos artificialmente en los dominios $\alpha 2$ - $\beta 2$.

Se llevó a cabo un experimento similar en el que se analizó la presentación monovalente y multivalente de construcciones I-E^d-pIII en paralelo. Estos resultados se muestran en la Figura 10. A bajo nivel de presentación de fagémidos (monovalentes), aproximadamente 1 – 10 % de los viriones portan una proteína de fusión (Bradbury y Marks, J Immunol Methods. 2004, 290 (1-2): 29.). No se ve por lo tanto, ninguna proteína de fusión aparente en estas muestras (muestras M13K07), a pesar de que la fusión se detecta fácilmente en un ensayo de ELISA mucho más sensible (Figura 4).

pMHC-pIII como reactivos de tinción de superficie celular

Para investigar si el péptido-MHC de clase II presentado como fusiones con pIII en bacteriófago podría usarse como reactivos de tinción similares a tetrámeros de pMHC II convencionales, se tiñeron células LD1 con HA^{aa110-120}/I-E^d-pIII o I-E^d-pIII sin péptido fusionado. Como se ve en la Figura 6a, no se observó ninguna tinción con fusiones de I-E^d-pIII en bacteriófagos producidos sin el péptido relevante, mientras que HA^{aa110-120}/I-E^d-pIII tiñó células con una intensidad aproximadamente 0,8 log más brillante. Como se ve en la Figura 6b, la tinción específica de péptidos se observa para los tres enlaces disulfuro investigados. La tinción positiva solamente se observó con las versiones de I-E^d-pIII estabilizadas por disulfuro y solamente con las versiones que albergan el péptido antigénico (HA^{aa110-120}). No se vio diferencia aparente entre los tres enlaces disulfuro modificado técnicamente; por lo tanto parecen actuar con eficacia similar.

Para abordar adicionalmente la funcionalidad de viriones que presentan pMHC-pIII, mCk^{aa40-48}/HLA-DR4-pIII, α I^{aa57-68}/HLA-DQ2.5 o α II^{aa62-72}/HLA-DQ2.5 se prepararon por rescate de fagémidos usando VCSM13 o HyperPhage™. Todas las fusiones de pMHC-pIII también se realizaron sin fusiones de péptidos antigénicos como controles. Estos viriones se ensayaron después en experimentos de citometría de flujo como se ha descrito. Como se ve en la Figura 9a, la tinción específica de péptidos se observó para células teñidas con mCk^{aa40-48}/HLA-DR4-pIII. En la Figura 9b y c, la presentación tanto multivalente como monovalente de α I^{aa57-68}/HLA-DQ2.5 muestra tinción específica de péptido. Notablemente, la aportación de fagos fue de 10^{12} ufc^{ampR} de presentación de α I^{aa57-68}/HLA-DQ2.5 empaquetado en VCSM13. Se demuestra tinción específica de péptido para α II^{aa62-72}/HLA-DQ2.5 en la Figura 9d.

10 *Análisis*

El principal obstáculo para el uso eficaz de moléculas de MHC de clase II recombinantes, solubles, está provocado por problemas de estabilidad inherentes de dichas moléculas modificadas técnicamente. Aunque se han adoptado una diversidad de enfoques de modificación técnica para superar esta limitación, no existe ningún enfoque genérico en la actualidad¹¹. Además, todas las vías usadas en la actualidad representan procedimientos costosos y que requieren mucho trabajo socavando en la práctica cualquier enfoque de alto rendimiento. Los presentes inventores han descubierto una solución atractiva a este problema mezclando la producción del MHC de clase II recombinante con tecnología de presentación de fagos¹². Esta no es solamente una plataforma de tecnología muy rápida y económica, sino que también posee la propiedad inherente de permitir usar enfoques de exploración combinatoria muy diversos. Dado el inmenso proteoma antigénico el espacio presentado por las moléculas de MHC se beneficiaría en gran medida de esta característica combinatoria por ejemplo en el descubrimiento de epítopos. Sin embargo, hasta la fecha dicho descubrimiento se ha limitado a tecnología incómoda y de bajo rendimiento basada en baculovirus¹³.

Mediante el uso de presentación en fagos, estarían fácilmente disponibles en un formato bien documentado y sencillo tamaños de repertorio varios órdenes de magnitud mayores¹². Aunque dicha presentación se ha explorado para la molécula de MHC de clase I¹⁴⁻¹⁶, ninguno de los enfoques presentados en fagos del MHC de clase I han demostrado ser funcionales hasta la fecha como sustituto de tetrámeros solubles, ya que aún debe obtenerse tinción específica de células¹⁶. A diferencia de la molécula de MHC de clase I, que puede producirse eficazmente como un único polipéptido¹⁸, la producción del MHC de clase II se complica por el hecho de que es un heterodímero de cadenas separadas, que contribuyen igualmente¹¹. Construyéndose en la tipología de pliegue de Ig, el pliegue funcional de MHC tanto de clase I como de clase II también requiere la formación de enlaces disulfuro intradominio¹⁹.

Un aspecto clave de la interacción nativa entre el MHC de clase II y su ligando afín, el receptor de linfocitos T, es la afinidad débil inherente²⁰. Para superar esta limitación en la sensibilidad cuando se usan moléculas de MHC de clase II recombinantes como reactivo de detección, ha sido necesaria la polimerización de las moléculas en tetrámeros o pentámeros¹¹. La producción de dichos polímeros implica un protocolo multietapa con manipulación sustancial. El uso de presentación de fagos permite aquí muy fácilmente dicha polimerización mediante el uso de tecnología ya disponible que permite presentación multimérica en el fago²¹.

Los inventores presentan en el presente documento una estrategia para obtener moléculas de MHC de clase II presentadas de forma funcional por presentación de fagémidos pIII. Para conseguir esto, las dos cadenas α y β se expresan como dos cadenas polipeptídicas separadas en *E. coli*, de las que una se fusiona con la cápsida de pIII, y se dirige al periplasma. En el periplasma oxidante, las dos cadenas forman heterodímeros estables aprovechando un nuevo enlace disulfuro artificial que obliga a la asociación de los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$. Múltiples posiciones en la interfaz de $\alpha 2$ - $\beta 2$ conservada de la molécula de MHC de clase II murina I-E^d puede dirigirse para sustituciones de aa que permiten la modificación técnica de un enlace disulfuro intercatenario artificial (Fig. 1 y 3). Presentando dichas moléculas de MHC artificiales en pIII usando presentación en fagos basada en fagémidos convencional, se presentan de hecho heterodímeros covalentes en las visiones (Fig. 5 y 10). Parece conservarse la integridad molecular ya que todas las moléculas, tanto wt (*de tipo silvestre*) como mutantes, son reactivas a un anticuerpo monoclonal (MAB 2G9) específico para la molécula de MHC de clase II murina I-E (Fig. 4). Las moléculas de I-E^d se modificaron técnicamente para presentar el péptido antigénico HA^{aa110-120} bien caracterizado²² como una unión covalente con la cadena β esencialmente como se ha descrito²³. Usando fagos que presentan estas moléculas recombinantes estabilizadas por enlaces disulfuro en citometría de flujo, se obtuvo tinción específica del hibridoma de linfocitos T LD1⁵, que alberga un receptor de linfocitos T específico para el complejo de I-E^d/HA^{aa110-120} (Fig. 6a y 6b). Resulta importante que solo se ha visto tinción específica con fusiones de I-E^d-pIII estabilizadas por disulfuro que albergan el péptido antigénico, mostrando realmente la funcionalidad del enfoque. Además, la presentación multivalente del resto de MHC parecía esencial para la tinción, ya que no se ha visto dicha tinción con presentación monovalente (datos no mostrados), lo que subraya la necesidad de elevar la afinidad funcional por encima de la de la interacción nativa. Esto representa el primer ejemplo hasta la fecha en el que se ha usado una molécula de MHC presentada en fagos para visualización directa de linfocitos T específicos complementarios de tecnología de tetrámeros de MHC clásica.

La clave para el éxito es la introducción del enlace disulfuro artificial que estabiliza la interfaz $\alpha 2$ - $\beta 2$ de la molécula de MHC de clase II. Este parece ser un enfoque genérico, ya que las posiciones identificadas están altamente conservadas entre moléculas de MHC de clase II, incluyendo HLA (Figs. 7 y 8). Esta naturaleza genérica está apoyada en gran medida por el hecho de que los otros tres complejos del MHC de clase II ensayados, concretamente $mCk^{aa40-48}/HLA-DR4$, $\alpha I^{aa57-68}/HLA-DQ2.5$ y $\alpha II^{aa62-72}/HLA-DQ2.5$, todos como fusiones de pIII, también mostraron tinción celular específica en citometría de flujo de una manera específica de péptido antigénico (Fig. 9). Como se esperaba, el rendimiento de la tinción y la dependencia de una interacción multivalente varió entre los complejos de pMHC II específicos y los clones de linfocitos T con los que reaccionaba. Por lo tanto, la dependencia de la multivalencia no era un acontecimiento de todo o nada, mostrado por tinción celular específica tanto por el $\alpha I^{aa57-68}/HLA-DQ2.5$ como el $\alpha II^{aa62-72}/HLA-DQ2.5$ en versiones monovalentes. La capacidad para tener una tinción positiva específicamente en citometría de flujo dependerá de parámetros tales como la afinidad intrínseca del receptor de linfocitos T particular hacia el pMHC, la densidad de receptor en el linfocito T y la capacidad de agrupamiento de receptores en la membrana. Es digno de mención que la tinción multivalente (Fig. 9b) y monovalente (Fig. 9c) con el $\alpha I^{aa57-68}/HLA-DQ2.5$ era casi idéntica a pesar de una aportación de fagos 1000 veces menores con la versión multivalente.

REFERENCIAS

1. Kersh, G.J. *et al.* Structural and Functional Consequences of Altering a Peptide MHC Anchor Residue. *Journal of Immunology* 166, 3345-3354 (2001).
2. Guex, N. y Peitsch, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723 (1997).
3. Welschhof, M. *et al.* The antigen-binding domain of a human IgG-anti-F(ab')₂ autoantibody. *PNAS* 94, 1902-1907 (1997).
4. Løset, G.Å., Lunde, E., Bogen, B., Brekke, O.H. y Sandlie, I. Functional phage display of two murine α/β T-cell receptors is strongly dependent on fusion format, mode and periplasmic folding assistance. *Protein Eng Des Sel.* 20, 461-472 (2007).
5. Taylor, A.H., Haberman, A.M., Gerhard, W. y Caton, A.J. Structure-function relationships among highly diverse T cells that recognize a determinant from influenza virus hemagglutinin. *J Exp Med* 172, 1643-1651 - (1990).
6. Sambrook, J. y Russell, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Edn. 3. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 2001).
7. Makela, O., Kaartinen, M., Pelkonen, J.L. y Karjalainen, K. Inheritance of antibody specificity V. Anti-2-phenyloxazolone in the mouse. *J Exp Med* 148, 1644-1660 (1978).
8. Casares, S., Bona, C.A. y Brumeanu, T.D. Engineering and characterization of a murine MHC class II-immunoglobulin chimera expressing an immunodominant CD4 T viral epitope. *Protein Eng* 10, 1295-1301 (1997).
9. Horton, R.M., Cai, Z.L., Ho, S.N. y Pease, L.R. Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 8, 528-535 (1990).
10. Løset, G.Å., Kristinsson, S.G. y Sandlie, I. Reliable titration of filamentous bacteriophages independent of pIII fusion moiety and genome size by using trypsin to restore wild-type pIII phenotype. *BioTechniques* 44, 551-554 (2008).
11. Vollers, S.S. y Stem, L.J. Class II major histocompatibility complex tetramer staining: progress, problems, and prospects. *Immunology* 123, 305-313 (2008).
12. Bratkovic, T. Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. *Cell Mol Life Sci* (2009).
13. Crawford, F. *et al.* Use of baculovirus MHC/peptide display libraries to characterize T-cell receptor ligands. *Immunol Rev* 210, 156-170 (2006).
14. Le Doussal, J., Piqueras, B., Dogan, I., Debre, P. y Gorochov, G. Phage display of peptide/major histocompatibility complex. *J Immunol Methods* 241, 147-158. (2000).
15. Kurokawa, M.S. *et al.* Expression of MHC class I molecules together with antigenic peptides on filamentous phages. *Immuol Lett* 80, 163-168 (2002).
16. Vest Hansen, N., Ostergaard Pedersen, L., Stryhn, A. y Buus, S. Phage display of peptide / major histocompatibility class I complexes. *Eur J Immunol* 31, 32-38 (2001).
17. Constantin, C.M., Bonney, E.E., Altman, J.D. y Strickland, O.L. Major histocompatibility complex (MHC) tetramer technology: an evaluation. *Biol Res Nurs* 4, 115-127 (2002).
18. Leisner, C. *et al.* One-Pot, Mix-and-Read Peptide-MHC Tetramers. *PLoS ONE* 3, e1678 (2008).
19. Halaby, D.M., Poupon, A. y Momon, J. The immunoglobulin fold family: sequence analysis and 3D structure comparisons. *Protein Eng* 12, 563-571 (1999).
20. Rudolph, M.G., Stanfield, R.L. y Wilson, I.A. How TCRs bind MHCs, peptides, and co-receptors. *Annu Rev Immunol* 24, 419-466 (2006).
21. Soltés, G. *et al.* On the influence of vector design on antibody phage display. *Journal of Biotechnology* 127, 626-637 (2007).
22. Schild, H. *et al.* Natural ligand motifs of H-2E molecules are allele specific and illustrate homology to HLA-DR molecules. *Int Immunol* 7, 1957-1965 (1995).
23. Kozono, H., White, J., Clements, J., Marrack, P. y Kappler, J. Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptides. *Nature* 369, 151-154 (1994).

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de MHC de clase II recombinante, que comprende:

- 5 (i) toda o parte de la parte extracelular de una cadena α de MHC de clase II;
 (ii) toda o parte de la parte extracelular de una cadena β de MHC de clase II;

en la que (i) y (ii) proporcionan un dominio de unión a péptido funcional y en la que (i) y (ii) se unen mediante un enlace disulfuro entre restos de cisteína localizados en el dominio α_2 de dicha cadena α y el dominio β_2 de dicha cadena β , en la que dichos restos de cisteína no están presentes en dominios α_2 y β_2 de MHC de clase II nativo, y en la que dicha molécula recombinante no comprende un motivo de cremallera de leucina.

2. La molécula de MHC de clase II recombinante de la reivindicación 1, en la que dicho enlace disulfuro se localiza entre restos de cisteína situados en Pro 96 ^{α_2} - Ser 119 ^{β_2} (rango 1), Ser 95 ^{α_2} - Ser 121 ^{β_2} (rango 2) o Arg 94 ^{α_2} - Asn 151 ^{β_2} (rango 3) de un isotipo de I-E murino o las localizaciones equivalentes en un isotipo de MHC de clase II alternativo.

3. La molécula de MHC de clase II recombinante de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que además se retiran uno o más de los restos de cisteína correspondientes a las posiciones 38, 42 o 106 de la secuencia de referencia H-2EB*01 (SEQ ID NO: 2) o uno o más de los restos de cisteína en localizaciones equivalentes en un isotipo de MHC de clase II alternativo.

4. Una molécula de MHC de clase II recombinante, que comprende:

- 25 (i) toda o parte de la parte extracelular de una cadena α de MHC de clase II;
 (ii) toda o parte de la parte extracelular de una cadena β de MHC de clase II;

en la que (i) y (ii) proporcionan un dominio de unión a péptido funcional y en la que (i) y (ii) se unen mediante un enlace disulfuro entre restos de cisteína localizados en el dominio α_2 de dicha cadena α y el dominio β_2 de dicha cadena β , en la que dichos restos de cisteína no están presentes en dominios α_2 y β_2 de MHC de clase II nativo, y en la que dicha molécula recombinante se expresa en la superficie de un fago filamentosos.

5. La molécula de MHC de clase II recombinante de la reivindicación 4, en la que dicho disulfuro se localiza entre restos de cisteína situados en Pro 96 ^{α_2} - Ser 119 ^{β_2} (rango 1), Ser 95 ^{α_2} - Ser 121 ^{β_2} (rango 2) o Arg 94 ^{α_2} - Asn 151 ^{β_2} (rango 3) de un isotipo de I-E murino o las localizaciones equivalentes en un isotipo de MHC de clase II alternativo, y/o en la que se retiran uno o más de los restos de cisteína correspondientes a las posiciones 38, 42 o 106 de la secuencia de referencia H-2EB*01 (SEQ ID NO: 2) o uno o más de los restos de cisteína en localizaciones equivalentes en un isotipo de MHC de clase II alternativo.

6. La molécula de MHC de clase II recombinante de la reivindicación 4 o reivindicación 5, en la que dicha molécula recombinante se expresa como una fusión con la proteína de superficie de fago gpIII, gpVII, gpVIII o gpIX.

7. La molécula de MHC de clase II recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha molécula es una molécula soluble.

8. La molécula de MHC de clase II recombinante de la reivindicación 7, en la que (i) o (ii) de dicha molécula se fusiona con una parte Fc de una inmunoglobulina.

9. La molécula de MHC de clase II recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicha molécula es multimérica.

10. La molécula de MHC de clase II recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que (i) y (ii) de dicha molécula derivan de moléculas de MHC de clase II de ratón o humano, preferentemente humano.

11. La molécula de MHC de clase II recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que dicha molécula se produce por un hospedador bacteriano.

12. La molécula de MHC de clase II recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que dicho enlace disulfuro proporciona el único medio de estabilización de la molécula de MHC de clase II.

13. La molécula de MHC de clase II recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que dicha molécula es capaz de teñir linfocitos T.

14. La molécula de MHC de clase II recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que dicha molécula comprende además un péptido unido con dicho dominio de unión a péptido.

15. Un método para producir una molécula de MHC de clase II recombinante, que comprende:

- (i) toda o parte de la parte extracelular de una cadena α de MHC de clase II;
- (ii) toda o parte de la parte extracelular de una cadena P de MHC de clase II;

5 en la que (i) y (ii) proporcionan un dominio de unión a péptido funcional y en la que (i) y (ii) se unen mediante un enlace disulfuro entre restos de cisteína localizados en el dominio $\alpha 2$ de dicha cadena α y el dominio $\beta 2$ de dicha cadena β , en la que dichos restos de cisteína no están presentes en dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ de MHC de clase II nativo, comprendiendo dicho método expresar dicha molécula recombinante en un hospedador procariota.

10 16. Un método para identificar epítomos peptídicos antigénicos que pueden reconocerse por linfocitos T, en el que dicho método comprende las etapas de poner en contacto una molécula de MHC de clase II recombinante de la reivindicación 14 con un receptor de linfocitos T y detectar la unión de dicha molécula de MHC de clase II recombinante con dicho receptor de linfocitos T.

15 17. Un método para detectar linfocitos T específicos de antígeno en una muestra, en el que dicho método comprende las etapas de poner en contacto una molécula de MHC de clase II recombinante de la reivindicación 14 con dicha muestra y detectar la unión de dicha molécula de MHC de clase II recombinante con dichos linfocitos T.

20 18. El método de la reivindicación 17, en el que dicho método se usa para detectar la presencia de linfocitos T específicos de enfermedad en una muestra y para diagnosticar la presencia o ausencia de enfermedad.

Figura 1.

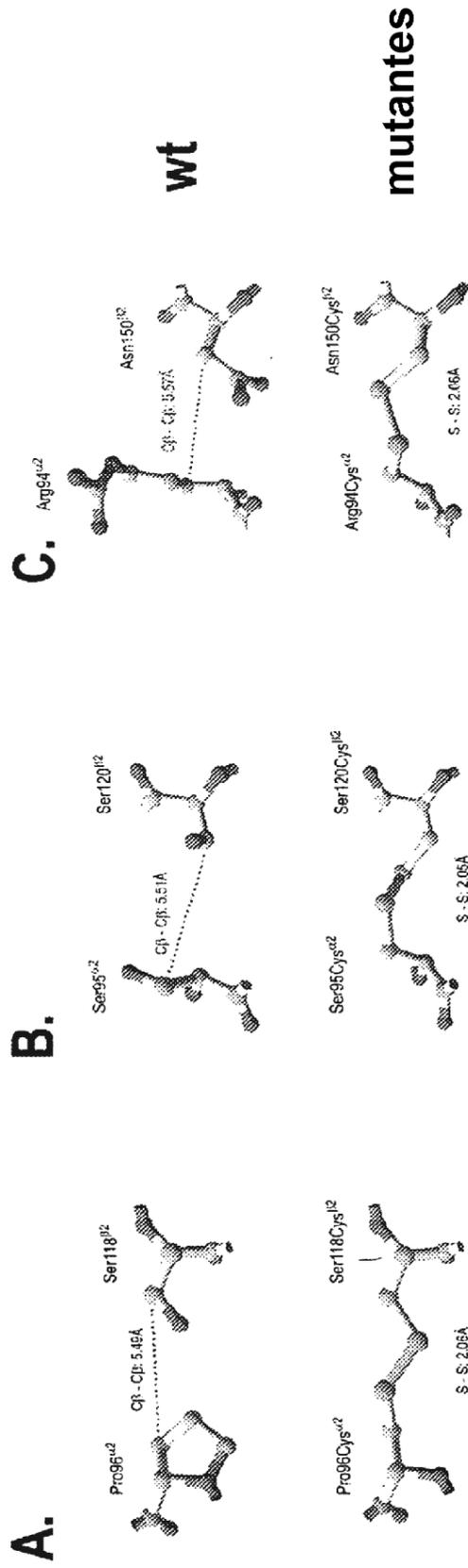


Figura 2.

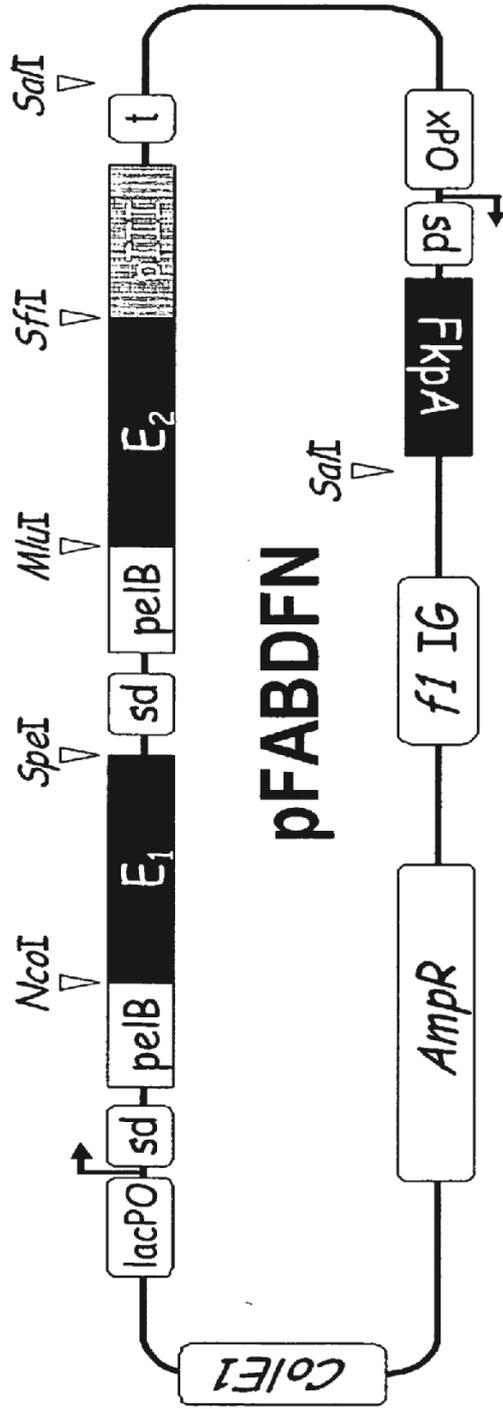


Figura 3

A.

```

|<-- péptido señal ---->|<----- dominio α1 -----
H-2EA*02 MATIGALLLRFFFI AVLMSQKSWA-IKEEHT-IIQAEFYLLPDKRGEFMFDFDGDEIFH 58
H-2EA_1FNG -----IKEEHT-IIQAEFYLLPDKRGEFMFDFDGDEIFH 33
H-2EA_EL -----IKEEHT-IIQAEFYLLPDKRGEFMFDFDGDEIFH 33
H-2AA*02 MPRSRALILGVLALTTMLSLCGGEDDIEADHVGSYGITVYQSPGDIGQYTFEFDGDELFY 60
          *: :*.      *  *.. *:: *:*:*:*:*:
          ----->|<-----
H-2EA*02 VDIEKSETIWRLEEFAKFASF EAQGANIAVDKANLDVMKERSNNTPDANVAPEVTVLS 118
H-2EA_1FNG VDIEKSETIWRLEEFAKFASF EAQGANIAVDKANLDVMKERSNNTPDANVAPEVTVLS 93
H-2EA_EL VDIEKSETIWRLEEFAKFASF EAQGANIAVDKANLDVMKERSNNTPDANVAPEVTVLS 93
H-2AA*02 VLDKKETVWMLPEFAQLRRFEPQGGLONIATGKHNLEILTKRSNSTPATNEAPQATVFP 120
          **::*.**:* * **::: **.*.* **..* **:::..**.*.* * * **::.*:
          ----->|<-----
          ----->|<----- dominio α2 ----->|<-----
H-2EA*02 RSPVNLGEPNILICFIDKFSPPVVNVTLRNGRPVTEGVSETVFLPRDDHLFRKFHYLTF 178
H-2EA_1FNG RSPVNLGEPNILICFIDKFSPPVVNVTLRNGRPVTEGVSETVFLPRDDHLFRKFHYLTF 153
H-2EA_EL RSPVNLGEPNILICFIDKFSPPVVNVTLRNGRPVTEGVSETVFLPRDDHLFRKFHYLTF 153
H-2AA*02 KSPVLLGQPNTLICFVDNIFPPVINITWLRNSKSVTDGVYETSFVNRDYSFHKLSYLTF 180
          :*** **:* ** * **::: **:*:*:*:*:..**:* ** * * : * : ** : **
          ----->|<----->|<----- TM ----->|<-----
H-2EA*02 LPSTDDFYDCEVDHWGLEEPLRKHWEFEEKILLPETTENVVCALGLFVGLVGIIVGIILI 238
H-2EA_1FNG LPSTDDFYDCEVDHWGLEEPLRKHWEFEE----- 182
H-2EA_EL LPSTDDFYDCEVDHWGLEEPLRKTWE----- 179
H-2AA*02 IPSDDDIDYDCKVEHWGLEEPLKHWEPEIPAPMSELTETVVCALGLSVGLVGIIVGTIFI 240
          :* *:*:*:*:*:*:*:*: * **
          |<----- citoplasmático
H-2EA*02 MRGIKKRNVVERRQGAL 255
H-2EA_1FNG -----
H-2EA_EL -----
H-2AA*02 IQGLRSGG-TSRHPGPL 256
    
```

B.

```

|<-- péptido señal ---->|<----- dominio β1 -----
H-2EB1*01 MVWLPRVPCVAAVILLTLVLSPPVALVRDSRPWFLEYCKSECHFNGTQVRLLERYFYIN 60
H-2EB_1FNG -----SRPWFLEYCKSECHFNGTQVRLLVRYFYIN 31
H-2EB_EL -----VRDTRPRFLEYVISECHFNGTQHVRFLERFIYN 34
H-2AB*02 MALQIPSLLLLAAVVVLTVLSSPGTEGGNSERHFVHQFPFCYFTNGTQIRLVIRIYIYN 60
          :. *.. . *:* **:::***: *:*:*
          ----->|<-----
H-2EB1*01 LEENLRFSDSDVGEFRAVTELGRPDAENWNSQPEFLEQKRAEVDTVCRHNYEISDKFLVRR 120
H-2EB_1FNG LEENLRFSDSDVGEFRAVTELGRPDAENWNSQPEFLEQKRAEVDTVCRHNYEIFDNFLVPR 91
H-2EB_EL REENLRFSDSDVGEYRAVTELGRPDAENWNSQPEILEDARASVDTYCRHNYEISDKFLVRR 94
H-2AB*02 REEYVRFSDSDVGEYRAVTELGRPDAEYWNKQ--YLERTRAELDTVCRHNYEKTETPTSLR 118
          * * :*****:***** ** * ** * : ** * ** * :. *
          ----->|<----- dominio β2 ----->|<-----
H-2EB1*01 RVE-PTVTVYPTKTQPLEHNNLLVCSVSDFYPGNIEVRWFRNGKEEKTGIVSTGLVRRNGD 179
H-2EB_1FNG RVE-PTVTVYPTKTQPLEHNNLLVCSVSDFYPGNIEVRWFRNGKEEKTGIVSTGLVRRNGD 150
H-2EB_EL RVE-PTVTVYPTKTQPLEHNNLLVCSVSDFYPGNIEVRWFRNGKEEETGIVSTGLVRRNGD 153
H-2AB*02 RLEQPSVVISLSRTEALNHNHTLVCSVTDYFPAKIKVRWFRNGQEETVGVSSQTQLIRNGD 178
          *.* *:*.: :*:.*:* **:::***:***:.*:*:*:*:*:* *.* * * :***
          ----->|<----->|<----- TM ----->|<-----
H-2EB1*01 WTFQTLVMLETVPQSGEVYTCQVEHPSLTDPTVVEWKAQSTSAQNKMLSGVGGFVLGLLF 239
H-2EB_1FNG WTFQTLVMLETVPQSGEVYTCQVEHPSLTDPTVVEW----- 186
H-2EB_EL WTFQTLVMLETVPQSGEVYTCQVEHPSLTDPTVVEWKAQSTSAQNK----- 199
H-2AB*02 WTFQVLVMLEMIPRRGEVYTCQVEHPSLKSPIVVEWRAQSESARSKMLSGIGGCVLGVIF 238
          ***.*** **.*: *****:***** **.* ** * : ** * :***
          ----->|<----- citoplasmático
H-2EB1*01 LGAGLIYFRNQKQSGLQPTGLLS 264
H-2EB_1FNG -----
H-2EB_EL -----
H-2AB*02 LGLGLFIRHRSQKGRGPPAGLLQ 263
    
```

Figura 4.

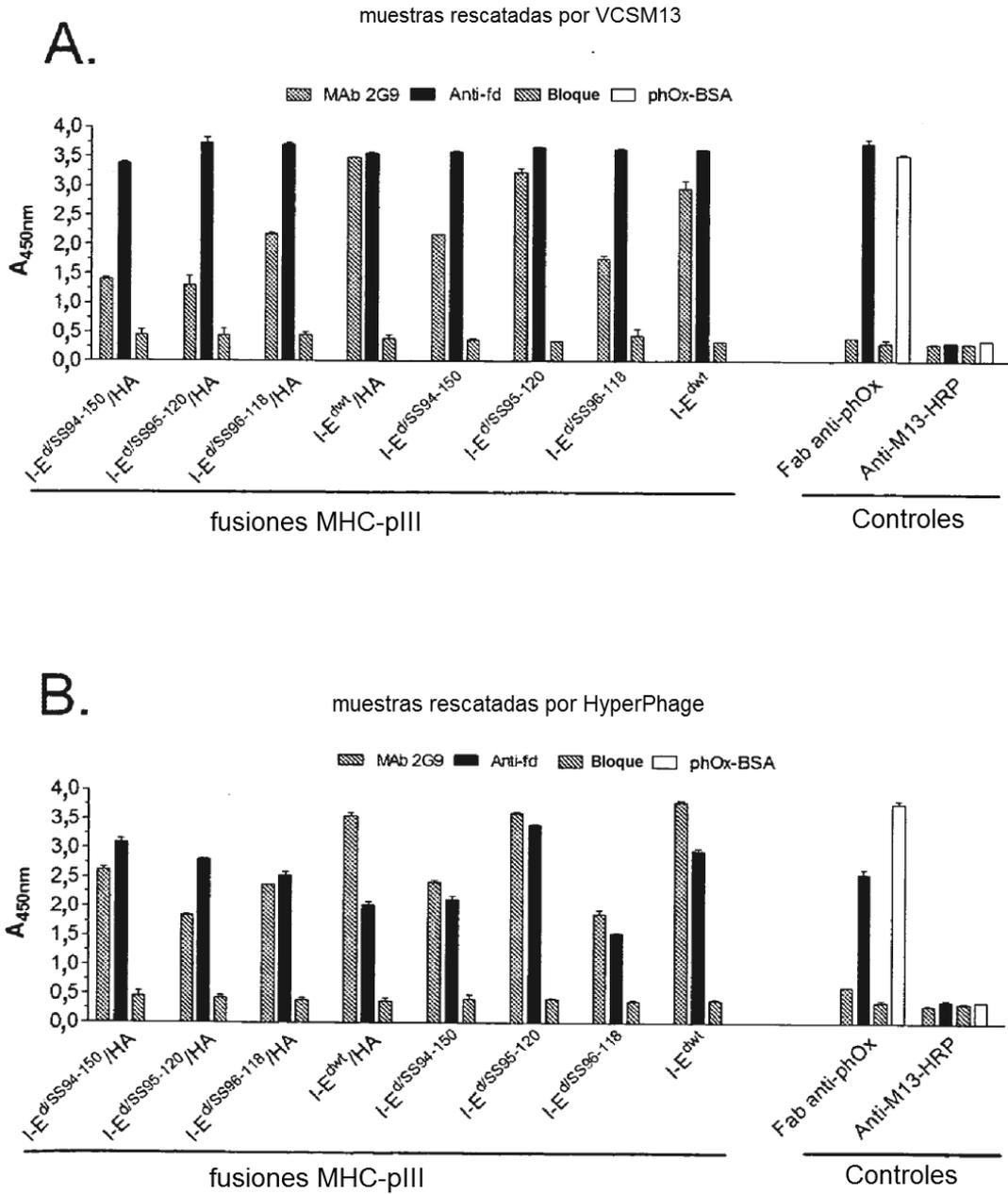


Figura 5.

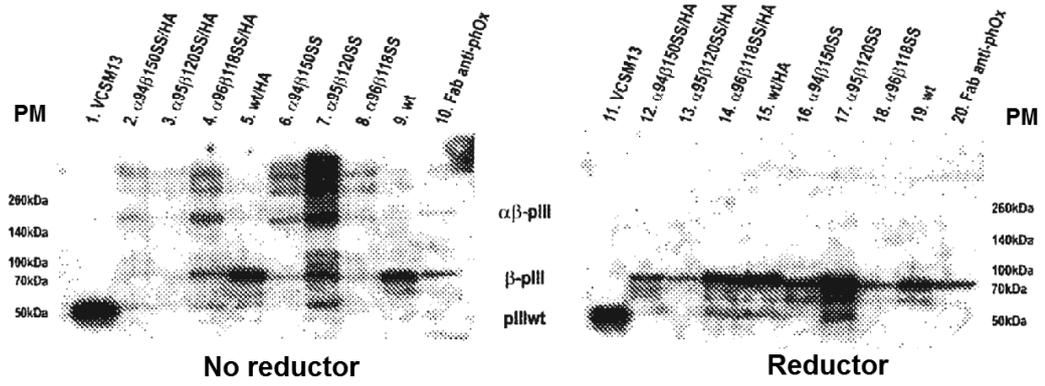


Figura 6a.

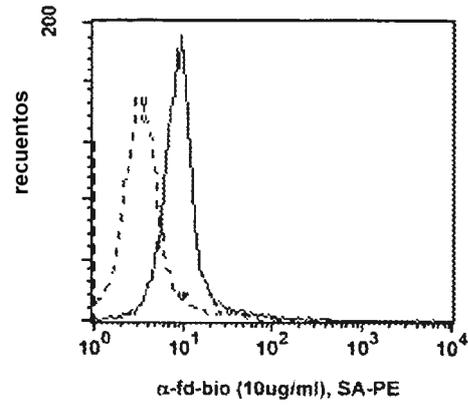


Figura 6b.

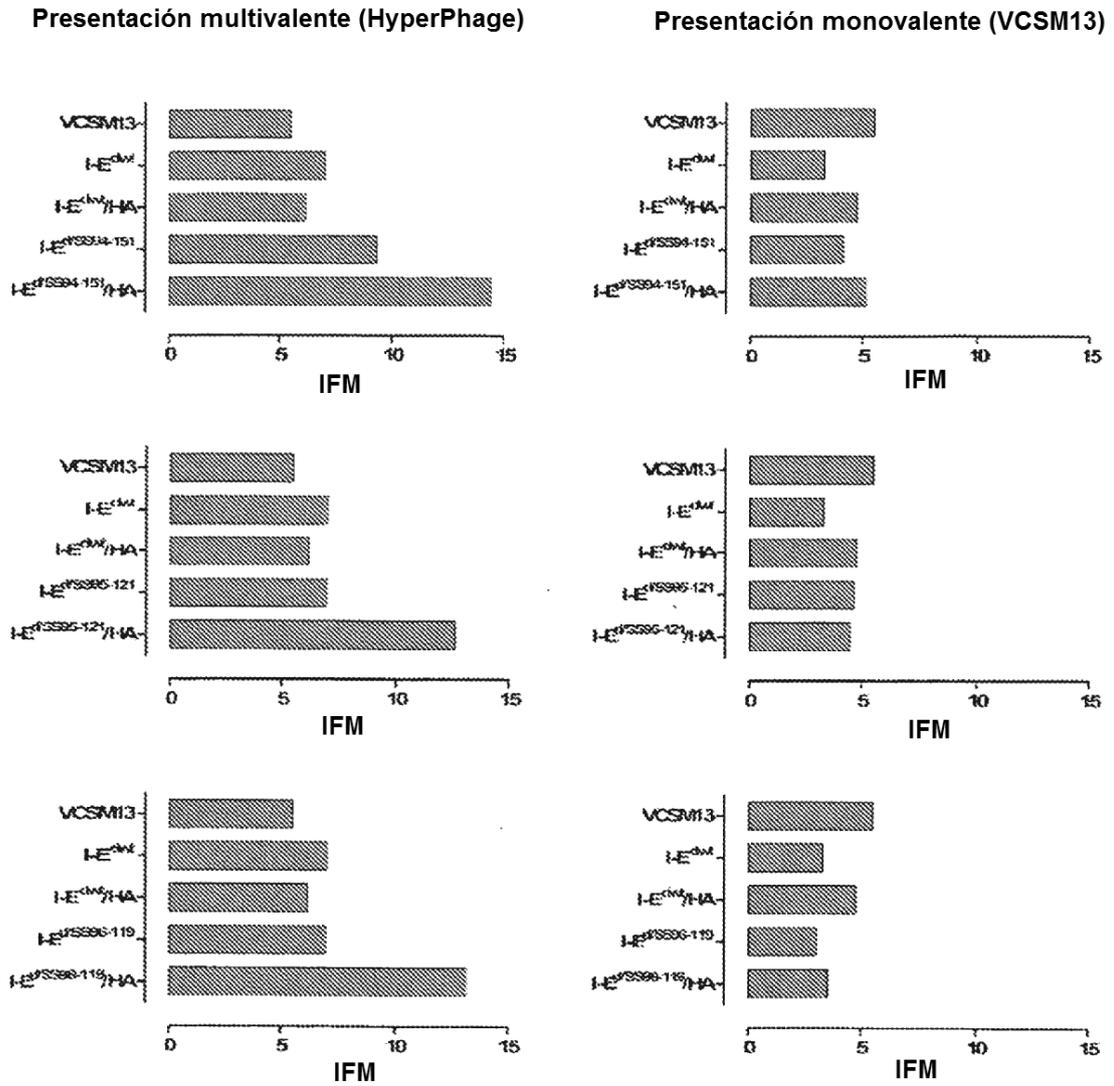


Figura 7.

A.

```

H-2AA      -----MPSRALILGLVALTTMLSLCGGEDDIEADHVGSYGITVYQSPGDIGQYTFEFD 54
HLA-DQA    -----MILNKALMLGALALTTVMSPCGGED-IVADHVASYGVNLYQSYGSPSGQYTHEFD 53
HLA-DPA    MRPEDRMFHIRAVILRALSLAFLLSLR-GAGAIKADHVSTY-AAFVQTHRPTGEFMFEFD 58
H-2EA      -----MATIGALLRFFFIIVLMSQ-KSWAIKEEHTIIQ-AEFYLLPDKRGEFMDFD 52
HLA-DRA    -----MAISGVPVVGFFIIIVLMSAQ-ESWAIKEEHVIIQ-AEFYLNPDQSGEFMDFD 52
           *      . : * : : : : *      * : * .      .      * : : : * *

H-2AA      GDELFYVDLDKKETVWMLPEFAQLRRFEPQGGQLONIATGKHNLEILTKRSNSTPATNEAP 114
HLA-DQA    GDEQFYVDLGRKETVWCLPVLQRQFR-FDPQFALTNIIVLKHNLNLSLIKRSNSTAATNEVP 112
HLA-DPA    EDEMFYVDLDKKETVWHLEEFQAFSFEAQGGLANIAILNMNLNLIQRSNHTQATNDPP 118
H-2EA      GDEIFHVDIEKSETIWRLEEFKAFSFEAQGALANIAVDKANLDVMKERSNNTPDANVAP 112
HLA-DRA    GDEIFHVDMAKKETVWRLEEFGRFASFEAQGALANIAVDKANLEIMTKRSNYTPTITNVPP 112
           ** * : * : : : * * : : : * : * * * * : * : : : * * * * : * *

H-2AA      QATVFPKSPVLLGQPNTLICFVDNIFPPVINITWLRNSKSVTDGVYETSEFFVNRDYSFHK 174
HLA-DQA    EVTVFSKSPVTLGQPNILICLVDNIFPPVNIITWLSNGHSVTEGVSETSFLSKSDHSFFK 172
HLA-DPA    EVTVFPKSPVELGQPNTLICIDKFFPPVNLVNTWLCNGELVTEGVAESLFLPRTDYSFHK 178
H-2EA      EVTVLSRSPVNLGEPNILICFIDKFSPPVNVVTWFRNGRPVTEGVSETVFLPRDDHLFRK 172
HLA-DRA    EVTVLTNSPVELREPNVILICFIDKFTPPVNVVTWLRNGKPVTTGVSETVFLPREDDHLFRK 172
           : . * : : * * * * : * : * * * * : * : * * * * : * : * * * *

H-2AA      LSYLTFIPSDDDIYDCKVEHWGLEEPVLKHWEPEIPAPMSELTETVVCALGLSVGLVGIV 234
HLA-DQA    ISYLTLPLSAEESYDCKVEHWGLDKPLLKHWEPEIPAPMSELTETVVCALGLSVGLVGIV 232
HLA-DPA    FHYLTFVPSAEDFYDCRVEHWGLDQPLLKHWEAQEPIQMPETTETVLCALGLVLGLVGII 238
H-2EA      FHYLTFLPSTDDFYDCEVDHWGLEEPLRKHWEFEKTLLETENNVCALGLFVGLVGIV 232
HLA-DRA    FHYLPFLPSTEDVYDCRVEHWGLDEPLLKHWEFDAPSPLPETTENVCALGLTVGLVGII 232
           : * * : : * * : : * * * * : * : * * * * : * * * * * : * * * * *

H-2AA      VGTIFIIQGLR-SGGTSRHPGPL 256
HLA-DQA    VGTVFIIRGLR-SVGASRHQGPL 254
HLA-DPA    VGTVLIKSLR-SGHDPRAGTL 260
H-2EA      VGIIILMKGIKRNVVERRQ GAL 255
HLA-DRA    IGTIFIIKVRKSNAAEERR-GPL 254
           : * : : * : : : :      * * . *
    
```

Figura 7

B.

```

H-2AB      ----MALQIP-SLLLLAAVVVLTVLSSPGTEGGNSERHFVHQFPFCYFTNGTQRIRLVI 55
HLA-DQB    MSWKKALRIPGGLRAATVTLMLSMSTPVAEGRDSPEDFVYQFKGMCYFTNGTERVRLVS 60
HLA-DPB    ---MMVLQVSAAPRTVALTALLMVLVTSVVQGRATPENYLFQGRQECYAFNGTQ--RFLE 55
H-2EB      ----MVWLPRVPCVAAVILLTTLVLSPPVALVRDSRPWFLEYCKSECHFNGTQQRVRLLE 55
HLA_DRB    ---MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMLVSSPLALAGDTRPRFLEYSTSECHFFNGTERVRFLE 57
           : : . . * : * . . : : : * : * * : * :

H-2AB      RYIYNREEYVRFDSVDVGEYRAVTELGRPDAEYWN--KQYLERTRAEALDTCRHNHYEKTET 113
HLA-DQB    RSIYNREEIVRFDSVDVGEFRAVTELLGLPAAEYWNSQKDILERKRAAVDRVCRHNYQ-LEL 119
HLA-DPB    RYIYNREEFARFDSVDVGEFRAVTELGRPAAEYWNSQKDILEEKRAVPDRMCRHNYE-LGG 114
H-2EB      RYFYNLEENLRFDSVDVGEFRAVTELGRPDAENWNSQPEFLEQKRAEVDTCRHNHYE-ISD 114
HLA_DRB    RYFHNQEENVRFDSVDVGEYRAVTELGRPDAEYWNSQKDLLEQORRAAVDTCRHNHYG-VGE 116
           * : : * * * * * * * : * * * * * * * : * * * * * * *

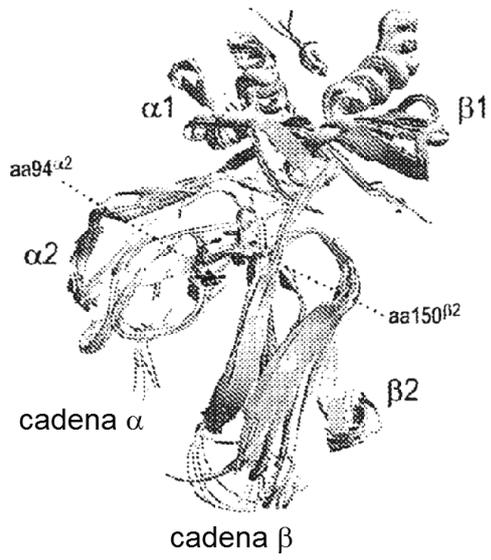
H-2AB      PTLRRLLEQPSVVISLSRTEALNHHNTLVCSVTDFYPAKIKVRWFRNGQEETVGVSTQL 173
HLA-DQB    RTTLQRRVEPTVTISPSRTEALNHHNLLVCSVTDFYPAQIKVRWFRNDQEETAGVVSTPL 179
HLA-DPB    PMTLQRRVQPRVNVSPSKKGPLQHHNLLVCHVTDFYPGSIQVRWFLNGQEETAGVVSTNL 174
H-2EB      KFLVRRRVEPTVTVYPTKQPLEHHNLLVCSVSDFYPGNIEVRWFRNGKEETGIVSTGL 174
HLA_DRB    SFTVQRRVHPKVTVYPSKTPQLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEETGIVSTGL 176
           : : * . * * : : . . : * * * * * * * : * * * * * * *

H-2AB      IRNGDWFQVLVMLEMTPRRGEVYTCHVEHPSLKSPITVEWRAQSESAQSKMLSGIGGCV 233
HLA-DQB    IRNGDWFQILVMLEMTPQRGDVYTCHVEHPSLQSPITVEWRAQSESAQSKMLSGIGGFV 239
HLA-DPB    IRNGDWFQILVMLEMTPQQGDVYTCQVEHTSLDSPVTVEWKAQSDSARSKTLTGAGGFV 234
H-2EB      VRNGDWFQTLVMLETVPQSGEVYTCQVEHPSLTDPTVEWKAQSTSAQNKMLSGVGGFV 234
HLA_DRB    IIRNGDWFQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFV 236
           : : * * * * * * * * * : * : * * * * * * * : * : * * * * * * *

H-2AB      LGVIFLGLGLFIRHRSQKGRGPPPPAGLLQ 263
HLA-DQB    LGLIFLGLGLIIHRSQKG-----LLH 261
HLA-DPB    LGLIICGVGIFMHRSKVKVQRGSA----- 258
H-2EB      LGLLFLGAGLFIYFRNQKQSGSLQPTGLLS 264
HLA_DRB    LGLLFLGAGLFIYFRNQKQHSGLQPRGF-- 264
           ** : : : * * : : : * . : *
    
```

Figura 8.

A.



B.

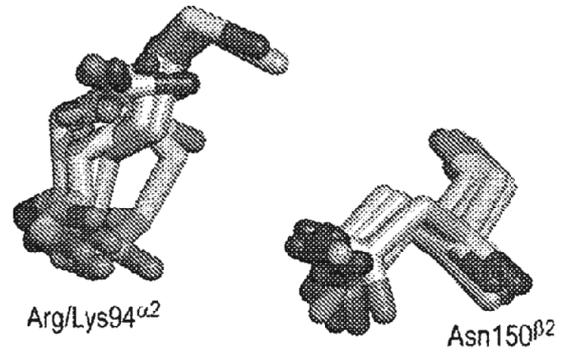


Figura 9.

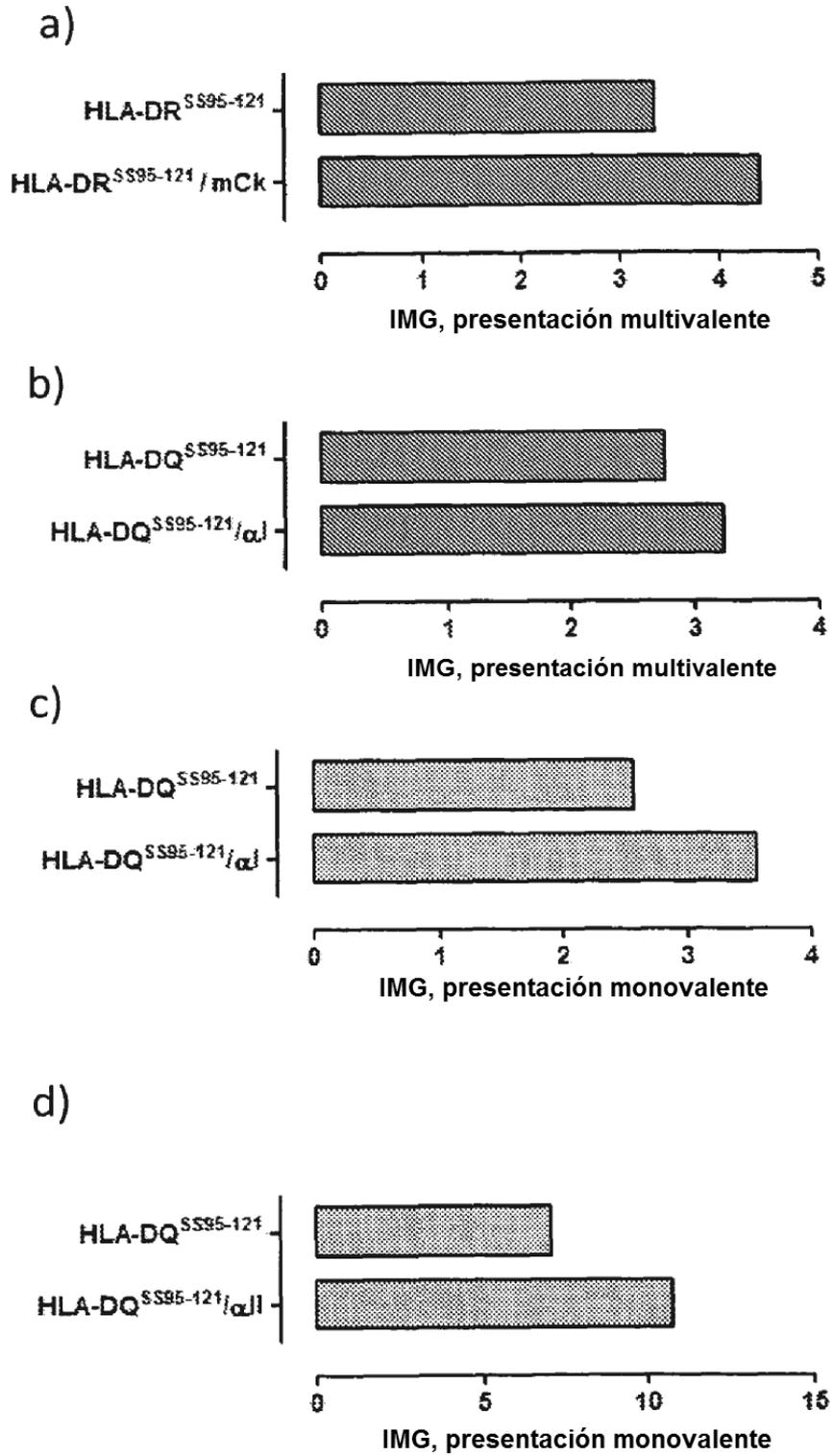


Figura 10.

