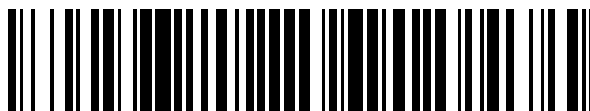


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 561**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2010 PCT/EP2010/054711**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.10.2010 WO10115984**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2010 E 10715774 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2417451**

54 Título: **Procedimiento de transferencia de polipéptidos en células**

30 Prioridad:

09.04.2009 EP 09157777

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

07.02.2018

73 Titular/es:

**LOPHIUS BIOSCIENCES GMBH (100.0%)
Am BioPark 13
93053 Regensburg , DE**

72 Inventor/es:

**BARABAS, SASCHA;
EDMAIER-SCHRÖGER, KATRIN y
DEML, LUDWIG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 653 561 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

Procedimiento de transferencia de polipéptidos en células

La presente invención se refiere a un procedimiento para la transferencia de polipéptidos dentro de células presentadoras de antígenos. La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para la detección de células inmunitarias específicas de polipéptidos y un procedimiento para la sensibilización, expansión y reactivación de linfocitos T específicos de polipéptidos.

La rama adquirida del sistema inmunitario consiste en una defensa inmunitaria humoral (inmunoglobulinas) y celular.

Los polipéptidos celulares y microbianos se procesan a partir de las células presentadoras de antígenos (APC) mediante la escisión específica y fragmentos (epítomos) de los mismos se presentan junto con moléculas del MHC de clase I y/o II en la superficie. Por medio de su receptor de linfocito T, los linfocitos T reconocen específicamente los epítomos presentados en el complejo con las proteínas del MHC y comienza la reacción inmunitaria.

Los linfocitos T se pueden subdividir en diferentes poblaciones efectoras que utilizan proteínas de superficie específicas. Los linfocitos T CD4⁺ (linfocitos T auxiliares) reconocen péptidos, que se les presentan en la superficie de las APC junto con proteínas del MHC de clase II y tienen un papel crucial en la orquestación y polarización de la defensa inmunitaria. Los linfocitos T auxiliares se pueden subclasificar en linfocito T auxiliar 1 (Th-1), T auxiliar 2 (Th-2) y auxiliar 17 (Th-17). Los linfocitos Th-1 se caracterizan por la producción de citocinas IFN- γ y TNF- α y la expresión del factor de transcripción T-bet. Los linfocitos Th-1 activan respuestas inmunitarias celulares aumentando la eficacia citolítica de los macrófagos y estimulando la proliferación de linfocitos CD8⁺ citotóxicos (linfocitos T citotóxicos (CTL) o linfocitos T CD4-CD8⁺). Los linfocitos Th-2 se caracterizan por la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y la producción del factor de transcripción GATA-3 y sustentan la producción de anticuerpos así como el cambio de clase de anticuerpo (rama humoral de la respuesta inmunitaria). Los linfocitos Th-17 se caracterizan por la producción de IL-17 y se cree que tiene un papel clave en enfermedades autoinmunitarias.

Además de linfocitos Th-1, Th-2 y Th-17, la población de linfocitos T CD4⁺ incluye aproximadamente un 10 % de linfocitos T reguladores que tienen un papel esencial en amortiguar las respuestas inmunitarias, en la prevención de enfermedades autoinmunitarias y en la tolerancia oral. Los linfocitos T reguladores se pueden subdividir en linfocitos T reguladores (Treg) naturales positivos a CD4, CD25 y CTLA4 así como linfocitos Th3 y Tr1, que se caracterizan por la producción de TGF- β (linfocitos Th3) o IL-10 (linfocitos Tr-1).

La importancia de los linfocitos T CD8⁺ se basa en el reconocimiento y destrucción de células degeneradas, neoplásicas y malignas así como tejidos y células que están infectadas por microorganismos o parásitos. Los linfocitos T son por lo tanto un mecanismo de protección importante del sistema inmunitario adquirido para la prevención y control de enfermedades microbianas, especialmente inducidas por virus, y por el reconocimiento y destrucción de células degeneradas y neoplásicas. Además de las poblaciones de linfocitos T mencionados anteriormente, se han descrito otras subpoblaciones de linfocitos T circulantes, que tienen un fenotipo doble positivo CD4⁺CD8⁺ (por ejemplo, linfocitos T CD4⁺CD8^{dim}, CD4^{dim}CD8^{brill} y CD4^{hi}CD8^{hi}).

Los linfocitos T CD4⁺CD8^{dim} expresan homodímeros CD8 $\alpha\alpha$ y se pueden detectar con baja frecuencia (menos del 2 % de la población total de linfocitos CD3⁺) en la sangre. Se observó una expansión transitoria o persistente de linfocitos T CD4⁺CD8^{dim} en personas sanas y también en pacientes con distintas enfermedades, incluyendo infecciones con diferentes virus, por ejemplo, el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y el citomegalovirus humano (CMV) así como pacientes con distintas enfermedades autoinmunitarias. Los linfocitos CD4^{dim}CD8^{brill} son un fenotipo activado de linfocitos T CD8⁺, como se determina por los niveles elevados de una cantidad de marcadores funcionales y de activación (CD95, CD25, CD38, CD69, CD28 y CD45RA⁺ CD45RA0⁺) en comparación con su equivalente CD4-CD8⁺. Los linfocitos T CD4^{hi}CD8^{hi} expresan altos niveles de moléculas CD4 y cadenas CD8 $\alpha\beta$ y están aumentados en afecciones autoinmunitarias.

Las APC profesionales tales como las células dendríticas, monocitos, macrófagos, pero también las APC no profesionales tales como los linfocitos B, neutrófilos y fibroblastos tiene un papel central en el desencadenamiento de la respuesta de linfocitos T contra inmunógenos exógenos y endógenos y en la inducción de la tolerancia de los linfocitos T a los tejidos endógenos. La activación y proliferación de linfocitos T tiene lugar por el desencadenamiento de dos señales simultáneas. La primera señal está guiada dentro del linfocito T por el receptor de linfocito T que reconoce el epítomo en asociación de MHC en la superficie de las APC.

La segunda, una señal co-estimulante está mediada por la interacción específica de moléculas co-estimulantes tales como B7.1 (CD80) o B7.2 (CD86) en las APC con el receptor relevante (tal como CD28) en la superficie del linfocito T. En ausencia de la señal co-estimulante, el linfocito T específico del epítomo se vuelve anérgico. La anergia se describe como un estado en el que los linfocitos T no se pueden multiplicar y no pueden responder a un antígeno.

La condición de un polipéptido determina decisivamente la eficacia y ruta del procesamiento del epítomo y la presentación por las APC. Además, el grado de activación de una APC y por lo tanto el perfil de la respuesta inmunitaria inducida está influenciada de manera adversa por la forma de administración de un polipéptido. Por lo tanto, la concentración y propiedades bioquímicas de un polipéptido así como la presencia o ausencia de sustancias

inmunomoduladoras (especialmente los componentes bacterianos tales como ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN positivo a CpG), lipopolisacáridos (LPS) y polipéptidos (por ejemplo, flagelina) así como citocinas (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ , IL-18, IL-23) son factores determinantes de si se activa la rama celular (inmunidad mediada por el tipo T auxiliar-1 (Th-1) o la humoral (respuesta inmunitaria mediada por el tipo T auxiliar-2 (Th-2)) del sistema inmunitario o si la respuesta inmunitaria se comporta como tolerogénica.

Hasta ahora, se han descrito solo unos pocos procedimientos para la translocalización de polipéptidos exógenos en células de mamífero. Además, solo se han descrito unos pocos procedimientos para la translocalización de polipéptidos exógenos en la ruta de procesamiento del MHC clase I de APC. Hasta ahora, por ejemplo, los procedimientos mecánicos de microinyección, electroporación y lipofección se habían utilizado con distintos resultados para transferir proteínas en las células.

Otros procedimientos para la transferencia de polipéptidos en las células se basan en la utilización de dominios de transducción de proteínas (PTD). Estas secuencias de aminoácidos ricas en arginina comprenden de 10 a 35 aminoácidos originados por ejemplo de la proteína Tat del VIH, proteína V22 del virus del herpes simple (HSV) o la homeoproteína Antenapedia (Antp) de *Drosophila*. Además, se determinaron secuencias PTD sintéticas por medio de bibliotecas de fagos. La prevalencia de la membrana y la translocalización de polipéptidos se pueden aumentar considerablemente por su acoplamiento con PTD.

Otros procedimientos descritos para la transferencia de proteínas en las células se basan en la utilización de distintas formulaciones lipídicas catiónicas o la incorporación de polipéptidos en partículas ISCOM® (CSL Limited, Victoria, Australia). Todos estos procedimientos son demasiado trabajosos y costosos para su uso rutinario. Además, muchos de los sistemas de transferencia particulares poseen propiedades citotóxicas (por ejemplo, los liposomas) o inmunomoduladoras (partículas ISCOM®) que en consecuencia pueden tener una influencia adversa sobre las propiedades naturales de las células tratadas.

Teniendo en mente la importancia de la respuesta inmunitaria celular, específicamente los linfocitos T citotóxicos (CTL) para controlar las infecciones microbianas y tumores, se están ensayando actualmente muchas nuevas estrategias para la sensibilización *in vivo* de CTL además de linfocitos T auxiliares. Estas incluyen el uso de péptidos, polipéptidos, proteínas, partículas tipo virus, bacterias vivas atenuadas y virus, vacunas vivas recombinantes (basadas en distintas bacterias y virus recombinantes) y vacunas de ADN.

Además, las APC autólogas tratadas *ex vivo* que presentan péptidos específicos en el contexto de proteínas de clase I y II del MHC son reactivos adecuados para la inducción de respuestas inmunitarias específicas de polipéptidos, especialmente en tratamientos terapéuticos. En estudios anteriores, se probó que las APC pulsadas con extractos tumorales, lisados celulares, plásmidos de expresión y el ARN mensajero eran adecuados para la inducción simultánea de respuestas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Herr y col. (2000), Blood, 96:1857). Además, se ha descrito en el documento EP 0 421 949 B1 que se podían utilizar alérgenos pre-tratados con cianato alcalinometálico para la inducción de anticuerpos específicos de la clase IgG.

En este momento, hay disponibles distintos procedimientos para estimular distintas poblaciones de células inmunitarias que son adecuadas en diferentes extremos para detectar poblaciones específicas de células inmunitarias específicas de antígeno.

La carga directa de proteínas del MHC unidas a la membrana con péptidos de una longitud determinada (óptimamente de 8-12 aminoácidos para la carga de las proteínas del MHC clase I y óptimamente 16 a 22 aminoácidos para la carga de las proteínas del MHC clase II) es un procedimiento que se utiliza frecuentemente para estimular las poblaciones definidas de células inmunitarias, especialmente los linfocitos T CD8⁺ y los linfocitos T CD4⁺. Además, se pueden utilizar péptidos 14 a 16 meros para la activación simultánea de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Sin embargo, hay importantes restricciones en el uso de este procedimiento de estimulación para la medición de linfocitos T específicos de proteína que se basan en el hecho de que el reconocimiento específico de epítopos de linfocitos T está sometido a una restricción del MHC; es decir, las personas que expresan diferentes proteínas del MHC reconocen epítopos diferentes de un polipéptido lo que hace que el análisis de linfocitos T específicos de polipéptidos en donantes de sangre con patrones de MHC variables sea considerablemente más difícil.

Además, los péptidos de diferente tamaño (8 a 12 meros y 18 a 22 meros) se presentan preferentemente en proteínas del MHC de clase I o clase II. Por lo tanto, solamente los linfocitos T que se dirigen contra epítopos conocidos en el contexto con proteínas del MHC definidas pueden registrarse específicamente utilizando este procedimiento.

De manera alternativa, los agrupamientos peptídicos (por ejemplo los péptidos 14 o 16 meros que se solapan en 13 aminoácidos), que abarcan la proteína completa se pueden utilizar para la detección simultánea de linfocitos T específicos de proteínas. Sin embargo, la producción de agrupamientos de péptidos solapados que cubren proteínas completas es cara y costosa.

Además, la aplicación de muchos péptidos incluyendo los epítopos de linfocitos T conocidos están restringidos por su baja capacidad para activar linfocitos T. En el presente documento, la eficacia de la activación de linfocitos T por los complejos MHC/péptido es dependiente de (i) la afinidad del péptido por la molécula del MHC, (ii) la estabilidad

de los complejos péptido MHC y (iii) por la afinidad del receptor de linfocito T a los complejos MHC/péptido.

Finalmente, solo se ha descrito una tecnología que aumenta la eficacia de los epítomos para estimular linfocitos T. El grupo de Peterson y colegas informaron que los epítomo de CTL restringidos a HLA A2, fosforilados revelaban una capacidad alterada para estimular CTL, cuando se compara con sus equivalentes no fosforilados (Petersen y col. (2009), PNAS 106: 2776-2781).

Por el contrario, los polipéptidos y proteínas solubles son adecuadas para detectar linfocitos T CD4⁺ específicos de polipéptidos independientemente de la restricción MHC del donante y el conocimiento detallado del epítomo de linfocito T localizado en un polipéptido. Los polipéptidos solubles se captan y recuperan casi exclusivamente mediante la ruta de procesamiento y presentación del MHC clase II en APC de manera que este procedimiento es adecuado casi exclusivamente para detectar linfocitos T CD4⁺.

Además, también se han descrito distintos procedimientos para desnaturalizar polipéptidos que hacen posible suministrar estos polipéptidos a la ruta de procesamiento y presentación del MHC clase I y MHC clase II. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, el tratamiento de los polipéptidos con calor o sulfato dodecil sódico (SDS). Estos procedimientos han demostrado ser adecuados para conseguir una presentación de epítomo en moléculas del MHC clase I y II en APC murinas (Schirmbeck y col. (1994), Eur. J. Immunol., 24:2068); (Schirmbeck y col. (1995), Vaccine, 13:857). En estos estudios se demostró que las proteínas desnaturalizadas de distintas formas son captadas en las APC por medio de distintos mecanismos y se diferencian en términos de su eficacia para inducir la carga polipeptídica de moléculas de MHC clase I. Por lo tanto, en comparación con las proteínas tratadas con SDS, los polipéptidos tratados utilizando el procedimiento de inactivación por calor (1 hora a 60 °C o 15 min a 100 °C) solamente se inducía una ligera estimulación de presentación del epítomo en las proteínas del MHC clase I en APC murinas tratadas. Por otra parte, el procedimiento de desnaturalización SDS demostró ser poco adecuado para su uso en cultivos celulares humanos debido a la alta toxicidad. Otro procedimiento para el pre-tratamiento de polipéptidos se describe en el documento EP 1 487 497 B1, en el que los polipéptidos se pre-tratan con urea.

Otro procedimiento para la estimulación la presentación de epítomos en el MHC clase I y II en APC se basa en la incorporación de polipéptidos en estructuras particulares, por ejemplo, liposomas, sustancias de vehículo particulares, partículas tipo virus o partículas lipoproteicas. Los primeros estudios confirman la idoneidad de partículas tipo virus Pr55^{gag} de VIH-1 para el diagnóstico de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Sester y col. (2000), AIDS, 14:2653-60). Sin embargo, la producción de polipéptidos unidos a partículas es cara y costosa.

Otro procedimiento para estimular la presentación de epítomos en el MHC clase I y II en APC se basa en la incorporación de polinucleótidos que codifican los polipéptidos deseados utilizando plásmidos, vectores víricos o no víricos. Una desventaja de la utilización de plásmidos para fines diagnósticos es la baja eficacia y los efectos citotóxicos de la transferencia de ácido nucleico en las APC utilizando los procedimientos de transfección disponibles hasta ahora, por ejemplo electroporación o lipofección. Los vectores bacterianos o víricos frecuentemente tienen tasas significativamente mayores de APC en comparación con los plásmidos. Sin embargo, estos sistemas de transferencia genética frecuentemente no son inertes inmunológicamente y modulan la capacidad de las APC para el procesamiento y presentación del epítomo de los polipéptidos. Además, el uso de estos procedimientos basados en ácido nucleico está limitado por la cara y costosa producción de transbordadores genéticos.

Hasta ahora los linfocitos T CD4⁺ se han detectado determinando la proliferación de las sustancias mensajeras (citocinas) producidas por los linfocitos T después de la estimulación. La proliferación celular se detecta habitualmente utilizando un ensayo de incorporación de timidina tritiada (³H-TdR) o ensayos de proliferación no radiomarcada tal como un ELISA de 5-bromo-2 desoxiuridina (BrdU), ensayo en microplaca de tetrazolio y ensayo de fosfatasa ácida.

La producción de citocinas de los linfocitos T CD4⁺ después de la estimulación específica con polipéptidos se puede determinar por medio de un ELISA de citocinas, un ensayo ELISPOT o por medio de tecnología FACS determinando las citocinas intracelulares (por ejemplo, tinción de citocinas intracelulares) o citocinas secretadas (por ejemplo, ensayo de secreción FACS).

Los linfocitos T CD8⁺ se han detectado convencionalmente determinando su actividad citotóxica específica o las sustancias mensajeras (citocinas) producidas por los linfocitos T CD8⁺ después de la estimulación específica, especialmente del interferón- γ (IFN- γ). La citotoxicidad se detecta habitualmente por medio de un ensayo de liberación de cromo clásico o un procedimiento no radioactivo adecuado en el que la liberación de enzimas o ATP de las células diana como resultado de la medición de la lisis específica por la célula efectora con propiedades citotóxicas.

La producción de citocinas a partir de linfocitos T CD8⁺ después de la estimulación específica de epítomos se puede determinar por medio de un ELISA de citocinas, un ensayo de ELISPOT o utilizando tecnología FACS determinando las citocinas intracelulares o las citocinas secretadas (ensayo de secreción FACS). Se utilizan habitualmente el IFN- γ , TNF e IL-2 como citocinas marcadoras para la presencia de linfocitos T CD8⁺ específicos de polipéptido. Hasta ahora, se han utilizado, APC autólogas que presentan epítomos de linfocitos T CD8⁺ en conjunción con proteínas de clase I en sus superficies, por ejemplo, para estimular linfocitos T CD8⁺ específicos de epítomo o polipéptido. La

inducción de la presentación de un epítipo mediado por el MHC clase I en las APC se había mediado hasta ahora incubando estas con los péptidos que albergan el epítipo de longitud adecuada (8 a 16 aminoácidos), incubando con lipopolipéptidos, polipéptidos particulares o polipéptidos empaquetados en estructuras particulares, lisados o células productoras de polipéptidos así como microorganismos vivos atenuados o recombinantes, especialmente virus o bacterias.

La tecnología de tetrámero (Coulter), pentámero (Proimmune) y estreptámero (IBA, Göttingen) son procedimientos para detectar linfocitos T CD8⁺ y linfocitos T CD4⁺ específicos de epítipo. Sin embargo las limitaciones de estos procedimientos para su uso amplio en el diagnóstico de linfocitos T se basan en los costes muy altos para la fabricación de estos reactivos. Además, los tetrámeros, pentámeros y estreptámeros han estado disponibles hasta ahora para un repertorio limitado de tipos de MHC, especialmente para las proteínas frecuentes del MHC clase I, por ejemplo, HLA A2. Además, esta técnica solo permite la detección de linfocitos T específicos de epítipos definidos. Las reactividades de los linfocitos T contra múltiples epítipos solo se puede determinar utilizando este procedimiento con una pérdida sustancial de tiempo y dinero.

Es por lo tanto el objetivo de la presente invención proporcionar un nuevo procedimiento para la transferencia de polipéptidos a las células.

Este objetivo se resuelva por la materia objeto definida en las reivindicaciones.

Se utilizan las siguientes figuras para explicar la invención.

La **Figura 1** muestra el mecanismo de reacción de la carbamoilación de aminas primarias. (A) La urea en equilibrio con amonio y cianato. El calor y/o el tiempo conducen la reacción hacia la rotura de la urea, produciendo la construcción de ácido ciánico. (B) A un pH neutro o básico, el ácido ciánico se somete a un ataque nucleofílico por las aminas primarias que forman la amina carbamoilada como se demuestra por la carbamoilación de proteínas, en la que el extremo amino especialmente y también las lisinas en general y otros aminoácidos de la proteína está carbamoiladas (Angel y col. (2007) Rapid Commun. Mass Spectrom. 21:1623).

La **Figura 2** muestra la acumulación de cianato en las soluciones de urea mantenidas a baja temperatura. Curvas A, B y C – 6,66, 3,33, y 1,11 M de urea, respectivamente, mantenida a 25 °C, Curva D – 6,66 M de urea mantenida a 5 °C (Marier y col. (1964) Analytical Biochemistry 7:304).

La **Figura 3** muestra la acumulación de cianato y los cambios relacionados en 6,66 M de urea mantenida a 85 °C (Marier y col. (1964) Analytical Biochemistry 7:304).

La Figura 4 muestra los cambios en la concentración de cianato en 6,66 M de urea mantenida a 25 °C. Curva A, re-equilibración de una solución calentada (es decir, a 80 °C, 50 minutos). Curva B – equilibración directa (Marier y col. (1964) Analytical Biochemistry 7:304).

La **Figura 5** muestra los cambios en la concentración de cianato en 8 M de urea a -40 °C y a 25 °C (Christison y col, "Direct Determination of Cyanate in a Urea Solution and a Urea Containing Protein Buffer Using a Reagent-Free Ion Chromatography System", Dionex (www.dionex.com)).

La **Figura 6** muestra que calentando los polipéptidos en una solución de 2 M de urea (concentración final) da como resultado un comportamiento de migración alterado de proteínas en geles de poliacrilamida. (A) 0,84 mg/ml de proteína p24 de la cápside de VIH (disuelta en 150 mM de NaCl, 50 mM de NaP, pH 7,6), (B) 1 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) o (C) 0,64 mg/ml de B19 de partículas VP2 de parvovirus (disueltas en un 38 % (p/v) de CsCl) se mezclaron 1:1:1 (vol/vol/vol) con (B,D,E) H₂O y 30 mM de Tris pH 3,9 o (A,C,F) solución 6 M de urea y 30 mM de Tris pH 3,9 e incubada después durante 60 minutos a 96 °C en un thermomixer. Después, se separaron las proteínas por (A) 12,5 % o (B,C) 10 % de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE) y se visualizaron las proteínas por tinción con azul brillante de Coomassie. M- Marcadores de peso molecular (A,B): Marcador proteico pre-teñido con Colour Plus, amplio intervalo NEB P7703; (C): marcador proteico pre-teñido, intervalo amplio NEB P7703. Los tamaños se indican en kilodaltons (kDa).

La **Figura 7** muestra que el tratamiento con urea siguiendo diferentes protocolos de carbamoilación da como resultado proteínas de BSA modificadas que revelan aumentos del peso molecular, como se muestra por la migración alterada en geles de poliacrilamida. Se mezcló 1 mg/ml de BSA 1:1:1 (vol/vol/vol) con (A) H₂O/HCl (pH 3,6) y 30 mM de Tris pH 3,6 o (B,C) solución de urea 6 M y 30 mM Tris pH 3,6 y se incubó (A) durante 0 min a 96 °C o (B) 30 min a 96 °C o (C) 60 min a 96 °C. (D) se trató el BSA siguiendo el protocolo de carbamoilación proteica por Angel y colegas (Angel y col. (2007) Rapid Commun. Mass Spectrom. 21:1623). 10 nmol de BSA se disolvieron en 100 µl de urea 8 M/200 mM Tris-HCl, pH 7,4. Esta solución se redujo con 20 mM de ditiotreitól (DTT) durante 2 horas a 50 °C, seguido por carbamidometilación con 45 mM de yodoacetamida (IDA) a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de proteínas desnaturalizadas, reducidas y alquiladas se diluyó 1:8 con 50 mM de bicarbonato amónico para ajustar la concentración de urea a 1 M y se incubó durante una noche a 37 °C. (E) Se trató el BSA como se describe en (D). Después, la solución se secó al vacío a 37 °C y se disolvió en 300 ml de urea 8 M/200 mM de Tris-HCl, pH 8,5. Después la muestra se agitó hasta la solubilización completa y después se incubó durante 4 horas a 80 °C, con agitado periódico (de acuerdo con Angel y col.

(2007) Rapid Commun. Mass Spectrom. 21:1623). Después, se separaron las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida-un 10 % de SDS (PAGE). Los tamaños se indican en kilodaltons (kDa).

La **Figura 8** muestra el tratamiento de BSA con urea después de diferentes protocolos de carbamiloilación que da como resultado proteínas de BSA modificadas que revelan un valor de pK_i alterado como se muestra por electroforesis en dos dimensiones. Se mezcló 1 mg/ml de BSA 1:1:1 (vol/vol/vol) con (A) H₂O/HCl (pH 3,6) y 30 mM de Tris pH 3,6 o (B,C) con una solución de urea 6 M y 30 mM de Tris pH 3,6 y se incubó durante (A) 0 min (B) 30 min o (C) 60 min a 96 °C. (D) se trató el BSA siguiendo un protocolo de carbamiloilación proteica descrita por Angel y colegas (Angel y col. (2007) Rapid Commun. Mass Spectrom. 21:1623). 10 nmol de BSA se disolvieron en 100 µl de urea 8 M/200 mM de Tris-HCl, pH 7,4. Esta solución se redujo con 20 mM de ditioneitol (DTT) durante 2 horas a 50 °C, seguido por carbamidometilación con 45 mM de yodoacetato (IDA) a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de proteínas desnaturalizadas, reducidas y alquiladas se diluyeron 1:8 con 50 mM de bicarbonato amónico para ajustar la concentración de urea a 1 M y se incubó durante una noche a 37 °C. Después, las proteínas se separaron por enfoque isoelectrico en tiras IEF (Immobiline™ DryStrip pH 3-10, 11 cm, GE Healthcare) a 26350 Vh seguido por electroforesis con un 10 % SDS/PAGE. Las proteínas se visualizaron por tinción con plata. M: marcador proteico pre-marcado, intervalo amplio NEB P7702. Los tamaños de las proteínas de referencia se indican en kilodaltons (kDa).

La **Figura 9** muestra que la modificación de BSA por el tratamiento con 2 M de urea, 10 mM de Tris (2 horas de incubación a 96 °C no está influenciada sustancialmente por el valor del pH, que varía desde un pH de 3,9 a pH 8,7. Se mezcló 1 mg/ml de BSA 1:1:1 (vol/vol/vol) con (A-C) 6 M de urea y (A) 30 mM de Tris pH 3,9 o (B) 30 mM de Tris pH 6,8 o (C) 30 mM Tris pH 8,7 o con (D-F) H₂O y (D) 30 mM de Tris pH 3,9 o (E) 30 mM de Tris pH 6,8 o (F) 30 mM de Tris pH 8,7 y después se incubaron durante 2 horas a 96 °C en un thermomixer (300 rpm). Después, se separaron las proteínas por SDS-PAGE al 10 % y se visualizaron las proteínas por tinción con azul brillante de Coomassie. M: marcador proteico pre-teñido, intervalo amplio NEB P7702. Los tamaños se indican en kilodaltons (kDa).

La **Figura 10** muestra que la eficacia de la modificación de BSA mediada por urea depende del tiempo de incubación. (A) se mezcló 1 mg/ml de albúmina del suero bovino (BSA) 1:1:1 (vol/vol/vol) con 6 M de urea y 30 mM de Tris pH 3,9 y se incubó a 96 °C durante los tiempos de incubación indicados (de 0 a 60 minutos). (B) se mezcló albúmina de suero bovino (BSA) 1:1:1 (vol/vol/vol) con 6 M de urea y 30 mM de Tris pH 3,9 y se incubaron a 96 °C durante los tiempos de incubación indicados (de 0-8 horas). Después, las proteínas se separaron por SDS-PAGE al 10 % y se visualizaron las proteínas por tinción con azul brillante de Coomassie. M: marcador proteico pre-teñido, intervalo amplio NEB P7702. Los tamaños se indican en kilodaltons (kDa).

La **Figura 11** muestra que la eficacia de la modificación de BSA mediada por urea es dependiente de la temperatura. Se mezcló 1 mg/ml de BSA en H₂O 1:1:1 (vol/vol/vol) con 6 M de urea y 30 mM de Tris pH 3,9 (calles A-L) y se incubó durante 2 horas a las temperaturas indicadas (de 0 a 96 °C). Después, se separaron las proteínas por SDS-PAGE al 10 % y se visualizaron las proteínas por tinción con azul brillante de Coomassie. M: marcador proteico pre-teñido, Intervalo amplio NEB P7702. Los tamaños se indican en kilodaltons (kDa).

La **Figura 12** muestra el tratamiento de la proteína IE1 de citomegalovirus humano (CMV) con urea depuesta (7 a 14 días a temperatura ambiente, que se calentó más de 1 hora a 96 °C) daba como resultado proteínas IE1 modificadas que revelaban un valor de pK_i alterado, como se muestra por electroforesis en dos dimensiones. (A) 100 µl de proteína IE1 (0,89 µg/ml en PBS) o (B) IE1 en PBS mezclados hasta un 1:1 (vol/vol) con 8 M de urea depuesta (calentada durante más de 1 hora a 96 °C, que se había mantenido durante 7 a 14 días a temperatura ambiente) se incubó durante una noche a 40 °C. Después, se separaron las proteínas por enfoque isoelectrico sobre tiras IEF (pH 3-10, lineal) a 38300 Vh seguido por un SDS-PAGE al 10 %. Las proteínas se visualizaron por tinción con plata. M: marcador proteico pre-teñido, intervalo amplio NEB P7702. Los tamaños se indican en kilodaltons (kDa).

La **Figura 13** muestra un análisis MALDI-TOF de BSA sin tratar y BSA tratado con urea depuesta. Los espectros se obtuvieron de (A) BSA no modificada, masa doble isotópica protonada 33230,3 y (B) BSA tras la mezcla (1:1; vol/vol) con 8 M de urea depuesta (7 a 14 días a temperatura ambiente, que se calentó durante 1 hora a 96 °C) masa doble-isotópica protonada 33497.

Por lo tanto, en las condiciones de ensayo descritas el tratamiento de BSA con urea inducía un cambio de masa de 226,7 Da.

La **Figura 14** muestra que la temperatura y el tiempo de incubación del pre-calentamiento de urea son factores críticos para la eficacia de modificación de BSA inducida con urea. 1 mg/ml de BSA en H₂O se mezcló 1:1 (vol/vol) con (A,C,E,G) solución de urea 4 M recién preparada, o (B,D,F,H) 4 M de urea que se pre-trató durante 1 hora a 96 °C y después enfriada rápidamente. Después las muestras se incubaron durante (A,B) 0 horas, (C,D) 2 horas, (E,F) 4 horas o (G,H) 17 horas a 40 °C en un thermomixer (a 300 rpm). Después, se separaron las proteínas por SDS-PAGE al 10 % y se visualizaron las proteínas por tinción con azul brillante de Coomassie. M: marcador proteico pre-teñido con Colour Plus, intervalo amplio NEB P7703. Los tamaños se indican en kilodaltons (kDa).

La **Figura 15** muestra que la incubación de urea depuesta durante 24 horas a 40 °C induce un cambio de masa de BSA. Se mezcló 1 mg/ml de BSA en H₂O 1:1 (vol/vol) con 4 M de urea depuesta (que se había tratado durante 1 hora a 96 °C y después se incubó durante 8 días a temperatura ambiente) y se incubó durante los puntos de tiempo (0 a 24 horas) a 40 °C. Después se separaron las proteínas por un SDS-PAGE al 10 % y se visualizaron las proteínas por tinción con azul brillante de Coomasie. M: marcador proteico pre-teñido con Colour Plus, intervalo amplio NEB P7703. Los tamaños se indican en kilodaltons (kDa).

La **Figura 16** muestra, que el tratamiento del BSA con urea seguido de diferentes protocolos de carbamoylación da como resultado proteínas de BSA modificada, revelando un valor de pK_i alterado, según se analizó por electroforesis de dos dimensiones. Se mezcló 1 mg/ml de BSA 1:1:1 (vol/vol/vol) con (A) H₂O/HCl (pH 3,6) y 30 mM de Tris pH 3,6 o (B,C) con una solución de urea 6 M y 30 mM de Tris pH 3,6 y (a) incubado durante 0 min, (B) 30 min o (C) 60 min a 96 °C. (D) Alternativamente, se mezclaron 10 mM de BSA 1:1 (vol/vol) con urea depuesta 4 M (calentada durante 1 hora a 96 °C, mantenida entonces durante 3 meses a temperatura ambiente) y se incubó durante 20 h a 40 °C. Después, las proteínas se separaron por enfoque isoeléctrico sobre tiras IEF a aproximadamente (A-D) 26350 Vh seguido por una electroforesis en SDS-PAGE al 10 %. Las proteínas se visualizaron por tinción con plata. Los tamaños de las proteínas de referencia se indican en kilodaltons (kDa).

La **Figura 17** muestra la carbamoylación química de BSA por cianato potásico. El BSA (1 mg/ml en agua) se mezcló 1:1 (vol/vol) durante 1 hora a 40 °C en un thermomixer con cianato potásico a concentraciones finales de (A) 0 mM, (B) 25 mM, (C) 100 mM, (D) 500 mM y (E) 1000 mM. Los productos de la reacción se separaron por SDS-PAGE al 10 % y se visualizaron por tinción con azul brillante de Coomasie. M: marcador proteico pre-teñido, intervalo amplio NEB P7702. Los tamaños se indican en kDa.

La **Figura 18** muestra la carbamoylación química de BSA por cianato potásico. Se mezcló el BSA (1 mg/ml en agua) (1:1 v/v) con una concentración creciente de soluciones acuosas de cianato potásico (concentración final de KOCN: (A) 0 mM, (B) 1 mM, (C) 5 mM, (D) 10 mM, (E) 20 mM, (F) 50 mM, (G) 100 mM, (H) 200 mM, (J) 500 mM. Después, las proteínas se incubaron durante 19,5 h a 40 °C en un thermomixer y posteriormente se separaron en un gel SDS al 10 %. Las proteínas se visualizaron por tinción con azul brillante de Coomasie. M: marcador de peso molecular (marcador proteico pre-teñido, intervalo amplio (Biolabs; NEB 7703), los tamaños se indican en kDa.

La **Figura 19** muestra la purificación por afinidad de las proteínas IE1 de citomegalovirus humano a partir de lisados de bacterias (M15[pREP4]) transfectadas con pGEX-KG-IE1. Las muestras de las etapas de purificación indicadas se separaron en una SDS-PAGE al 12,5 % y se tiñeron con azul brillante de Coomasie. Marcador: marcador proteico pre-teñido Intervalo amplio (Biolabs: NEB 7703)). Los tamaños de las proteínas se indican en kDa.

La **Figura 20** muestra el aumento de la capacidad de los polipéptidos modificados con urea para reactivar linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺ por los análisis de citometría de flujo de sangre completa heparinizada de un individuo positivo a HLA A2 positivo a CMV tras la re-estimulación con péptidos sintéticos o proteína IE1 recombinante en formas carbamoylada o no carbamoylada. En estos experimentos, la proteína IE1 purificada (0,89 µg/ml en PBS) se mezcló 1:1 (vol/vol) con 8 M de urea depuesta (pre-incubada durante una noche a 96 °C) y se incubó durante una noche a 40 °C. Los péptidos (10 µg/µl en un 100 % de DMSO) se mezclaron 1:1 (vol/vol) con 8 M de urea depuesta (pre-incubada durante una noche a 96 °C) y se incubó durante una noche a 40 °C. Se muestran los linfocitos Th CD4⁺ y los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y se analizaron en cuanto a la secreción de IFN-γ según se determina por tinción de la citocina intracelular. La sangre completa heparinizada de un individuo seropositivo a CMV, positivo a HLA A2 se estimuló durante 6 horas con proteínas IE1 tratadas o no tratadas con urea o el péptido YIL (que representa un epítipo CTL restringido a HLA A2 en la proteína IE1) y la activación de linfocitos CD4⁺ o CD8⁺ específicos de IE1 o YIL se determinó por tinción del IFN-γ intracelular. Las células estimuladas con un péptido de control, que representan un epítipo murino de CTL en la proteína p24 de VIH servían como control negativo. La secreción de citocina de las células activadas se inhibió por adición de Brefeldin A durante las últimas 4 horas de estimulación. Los gráficos muestran el log de intensidad de fluorescencia.

La **Figura 21** muestra el aumento de capacidad de péptidos carbamoylados por urea y cianato para reactivar específicamente linfocitos T CD8⁺ en sangre completa heparinizada de un individuo positivo a CMV, positivo a HLA A2 como se muestra por análisis de citometría de flujo. En estos experimentos, el péptido sintético YIL (10 µg/µl) en un 100 % de DMSO) se mezcló 1:1 (vol/vol) con 9 M de urea depuesta (pre-incubada durante una noche a 96 °C) o 200 mM de cianato potásico en H₂O_{dest} y se incubó durante una noche a 40 °C. Después se estimuló sangre completa heparinizada de un individuo seropositivo a CMV positivo a HLA-A2, durante 9 horas con 10 µg/ml de péptido E10F, que cubre el epítipo murino de CTL en la región de la p24 de la cápside de VIH-1 (BH10) Gag (aa 291-300) (Wild y col., (2004) Vaccine. 2004;22:1732-1743) o el péptido YIL (que representa un epítipo de CTL restringido a HLA A2 de la proteína IE1) o de manera alternativa el péptido YIL, que estaba carbamoylado con 100 mM de KOCN o 4 M de urea depuesta. Para los controles, las células se estimularon con 4 mM de urea o 200 mM de KOCN. La activación de los linfocitos T CD8⁺ específicos de PSA o YIL se inhibieron con Brefeldin A durante las últimas 7 horas de estimulación. Los gráficos muestran el log de intensidad de fluorescencia.

La **Figura 22** muestra los análisis de citometría de flujo de células esplénicas de ratones inmunizados con p24 no modificada o carbamoilada en ausencia o presencia de ODN CpG 1668 inmunoestimulante después de la re-estimulación con péptidos sintéticos que representan epítomos de CTL específicos de p24 o epítomos de CTL no relacionados. Los controles incluyen células esplénicas re-estimuladas específica o no específicamente de ratones inmunizados con PBS o VLP Gag de HIV. Se muestra el número de linfocitos CD8⁺ analizados en cuanto a la secreción de IFN- γ como se determina por la tinción de citocinas intracelulares. En estos experimentos se inmunizaron 6 ratones BALB/c con proteína p24 de VIH modificada o no modificada con urea en ausencia o presencia de ODN CpG 1668 inmunoestimulante (Bauer y col., (1999) *Immunology* 97:699). Para los controles negativos y positivos, se inmunizaron los ratones con PBS o partículas tipo virus (VLP) Gag de VIH (Deml y col. 2005, *Mol. Immunol.* 42:259). Las semanas dos y cuatro después de la inmunización primaria los ratones recibieron una inyección de refuerzo con el mismo inmunógeno. A los 7 días después de la primera y segunda inyección de refuerzo, se obtuvieron las células esplénicas de cada tres ratones por grupo y se re-estimularon 2 x 10⁶ células durante 6 horas con 10 μ g del péptido p24 tipo C de VIH (AMQLKDTI (SEQ ID NO: 1); aa 197-205 en el caso de ratones inmunizados con p24) o el péptido A91 de VIH1AI (AMQMLKETI (SEQ ID NO: 2); aa 197-205 (Wild y col. (2004), *Vaccine* 22:1732)) en el caso de ratones inmunizados con partículas tipo virus (VLP) en presencia de Brefeldin A. Para el control, las células esplénicas se estimularon con un péptido de control, que representa un epítomo CTL humano del antígeno específico de próstata (PSA 141-150 FLTPKLLQCV (SEQ ID NO: 3); Chakraborty y col. (2003), *Cancer Immunol. Immunother.* 52:497) en presencia de Brefeldin A. Se muestran los valores medios más la desviación estándar (SD) del número de linfocitos CD8⁺ que expresan IFN- γ .

La **Figura 23** muestra el aumento de capacidad del (A) péptido YIL y (B) proteína pp65 de CMV carbamoiladas con cianato para reactivar específicamente los linfocitos T CD8⁺ en sangre entera heparinizada de un individuo seropositivo a CMV, positivo a HLA A2 como se muestra por análisis de citometría de flujo. En estos experimentos, el péptido YIL sintético que representa un epítomo de CTL restringido a HLA A2 en la proteína IE1 de CMV (YILEETSVML (SEQ ID NO: 4); aminoácidos 315-324; Prod'homme y col. (2003), *J. Immunol.* 170:2030) se disolvió en un 100 % de DMSO con una concentración final de 2 μ g/ μ l. La región inmunodominante de la proteína pp65 de CMV (cepa AD169) (aa 862-1048; RecMol UL83-pp65, N° de Cat. 1B023A) se disolvió en H₂O incluyendo 140 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 1,8 mM de KH₂PO₄ y concentraciones crecientes de KOCN (0 mM, 100 mM, 100 mM y 500 mM) y se incubó durante una noche a 40 °C. Después, se estimuló la sangre completa heparinizada de un individuo seropositivo a CMV, positivo a HLA A2 durante 6 horas con 10 μ g/ml de los péptidos o proteínas pp65 carbamoilados con cianato potásico indicado en presencia de 0,04 M de urea recién preparada. Se añadieron anticuerpos (BD) monoclonales anti-CD49d y anti-CD28 para la co-estimulación de acuerdo con el protocolo del fabricante. La activación de linfocitos T CD8⁺ se determinaron por tinción de IFN- γ intracelular utilizando tecnología FACS. La secreción de citocina de las células activadas se inhibía añadiendo 10 μ g/ml de Brefeldin A (Sigma) durante las 4 últimas horas de estimulación. Se utilizaron los siguientes reactivos para el análisis de citometría de flujo, a menos de que se señale otra cosa: anti CD8 (clon B.911) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FTTC), anti-CD3 (clon UCHT1) conjugado con ficoeritrina Texas rojo (ECD) y un anticuerpo anti- IFN- γ (clon 45.15) conjugado con ficoeritrina (PE) (todos de Beckman Coulter). Los marcadores intracelulares se tiñeron a continuación la tinción de los marcadores de superficie, la fijación y la permeabilización de las células. Las células teñidas se procesaron en un citómetro de flujo FACS Epics XL MCL (Beckman Coulter). La regulación viva de linfocitos y eventos CD3⁺ se llevó a cabo durante la adquisición. Se adquirieron hasta 2 x 10⁶ eventos para cada análisis. Los resultados se expusieron como el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ regulados que producen IFN- γ en respuesta a la estimulación específica.

Las abreviaturas utilizadas en general para los nucleótidos y aminoácidos se utilizan en la presente invención.

El término "polinucleótido" como se utiliza en el presente documento denota la forma polimérica de nucleótidos de longitud arbitraria, preferentemente desoxirribonucleótidos (ADN) o ribonucleótidos (ARN). El término solo denota la estructura primaria de la molécula. El término incluyen un ADN o ARN de cadena doble o sencilla, por ejemplo, polinucleótidos señuelo o antisentido así como oligodesoxinucleótidos sintéticos (ODN) y ODN con matriz resistente a nucleasas.

El término "polipéptido" o "proteína" como se utiliza en el presente documento denota un polímero de aminoácidos de longitud arbitraria. Preferentemente, el término "polipéptido" como se utiliza en el presente documento se refiere a un polímero de aminoácidos que consiste en más de 6 restos de aminoácidos. El término polipéptido también comprende los términos epítomo, péptido, oligopéptido, proteína, poliproteína y agregados de polipéptidos. También se incluyen en este término polipéptidos que tienen modificaciones post-traduccionales, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y modificaciones similares así como modificaciones químicas tales como carbamoilaciones, tiocarbamoilaciones, grupos guanidina sustituidos y modificaciones similares. Este término comprende adicionalmente, por ejemplo, polipéptidos que tienen uno o una pluralidad de análogos de aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos no naturales), polipéptidos con enlaces sustituidos así como otras modificaciones que están en la experiencia de la técnica, independientemente de si se producen naturalmente o son de origen no natural.

El término "carbamoilación" como se utiliza en el presente documento significa la transferencia del carbamoilo de una molécula que contiene carbamoilo (por ejemplo, fosfato de carbamoilo) a un resto receptor tal como un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo sulfhidrilo, un grupo fosfato, un grupo hidroxilo o un grupo imidazol. Además, el

término “carbamoilación” como se utiliza en el presente documento comprende adicionalmente la tiocarbamoilación de polipéptidos.

5 El término “carbamoilo” como se utiliza en el presente documento significa un radical acilo, $\text{NH}_2\text{-CO-}$. La transferencia del grupo carbamoilo tiene un papel importante en ciertas reacciones bioquímicas; por ejemplo, en el ciclo de la urea, mediante el fosfato carbamoilo. El término “carbamoilo” como se utiliza en el presente documento comprende el grupo tiocarbamoilo ($\text{NH}_2\text{-CS-}$).

10 El término “cianato” como se utiliza en el presente documento se refiere al anión NCO^- derivado del ácido ciánico (HNCO) y cualquier sal del ácido ciánico. Además, el término “cianato” como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier compuesto orgánico de estructura R-CON , en el que R es cualquier resto orgánico. En particular, el término “cianato” se utiliza en el presente documento se refiere también a isocianato e isotiocianato.

15 Los términos “purificado” y “aislado” como se utilizan en el presente documento significan que una molécula, por ejemplo, un polipéptido o una secuencia de ácido nucleico está presente en la ausencia más completa posible de macromoléculas biológicas de tipo comparable. Los términos significan un peso fraccional del producto deseado de al menos un 65 %, preferentemente de al menos el 75 %, preferentemente de al menos el 95 %, particularmente preferentemente de al menos el 95 % y especialmente preferentemente de al menos el 98 % del peso total de las macromoléculas biológicas presentes. Sin embargo, el agua, un tampón y otras moléculas pequeñas, especialmente las moléculas que tienen un peso molecular de menos de 1000 Daltons no se incluyen en la expresión de “macromoléculas biológicas” que se utiliza en el presente documento.

20 El término “epítipo” como se utiliza en el presente documento designa la región de un polipéptido que posee propiedades antigénicas y por ejemplo, sirve como sitio de reconocimiento para los linfocitos T o inmunoglobulinas. En el sentido de la presente invención los epítipos son las regiones de los polipéptidos que son reconocidas por las células inmunitarias tales como, por ejemplo, los linfocitos T CD4^+ , linfocitos T CD8^+ , linfocitos T $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$, linfocitos T $\text{CD4}^+\text{CD8}^{\text{dim}}$, linfocitos T NK $\text{CD56}^+\text{CD8}^+$ y $\text{CD56-CD57}^+\text{CD8}^+$ o linfocitos T reguladores CD4^+ . Un epítipo puede comprender 3 o más aminoácidos. Habitualmente, un epítipo consiste al menos en 6 o 7 aminoácidos o, lo que es más común, 8 a 12 aminoácidos, o 13 a 18 aminoácidos. Sin embargo, un epítipo puede consistir también en más de 18 aminoácidos e – incluso más raramente – de más de 30 aminoácidos. El término “epítipo” como se utiliza en el presente documento también comprende una conformación espacial única para el epítipo. Esta conformación espacial se obtiene de la secuencia de aminoácidos en la región del epítipo.

30 El término “microorganismo” que se utiliza en el presente documento designa virus, microbios procariontes y eucariotas, tal como por ejemplo, arqueobacterias, bacterias, células únicas y hongos, en los que el último grupo comprende por ejemplo, levaduras y hongos filamentosos.

35 La expresión “células inmunitarias” como se utilizan en el presente documento denota linfocitos con propiedades auxiliares, citolíticas o reguladoras tales como por ejemplo, linfocitos T CD4^+ , linfocitos T CD8^+ , linfocitos T $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$, linfocitos T $\text{CD4}^+\text{CD8}^{\text{dim}}$, linfocitos T reguladores CD4^+ , linfocitos T NK $\text{CD56}^+\text{CD8}^+$ y $\text{CD56-CD57}^+\text{CD8}^+$ así como linfocitos NK $\text{CD16}^+\text{CD56}^+$. Sin embargo, la expresión “células inmunitarias” como se utilizan en el presente documento no significa solo las células inmunitarias que se mantienen y multiplican *in vitro* en medios de cultivo sino también poblaciones de células inmunitarias que se toman de un donante de sangre sano, un paciente o un animal así como respectivamente células inmunitarias purificadas.

40 La expresión “linfocitos T específicos de polipéptidos” como se utiliza en el presente documento se refiere a todo tipo de linfocitos T que tienen receptores para los sitios de unión específicos de polipéptidos específicos como por ejemplo, linfocitos T CD4^+ , linfocitos T CD8^+ y linfocitos T CD4^+ reguladores. La expresión “linfocitos T específicos de polipéptidos” como se utiliza en el presente documento comprende también las células específicas de epítipo, específicas de antígeno y estimulables por inmunógeno.

45 La expresión “linfocito T CD4^+ ” como se utiliza en el presente documento se refiere a linfocitos T auxiliares, que orquestan la activación de macrófagos y linfocitos T CD8^+ (linfocitos Th-1), la producción de anticuerpos y de linfocitos B (linfocitos Th-2) o que se cree que tienen un papel esencial en enfermedades autoinmunitarias (linfocitos Th-17). Además, la expresión “linfocitos T CD4^+ ” también se refiere a linfocitos T reguladores que representan aproximadamente un 10 % de la población total de linfocitos T CD4^+ . Los linfocitos T reguladores tienen un papel esencial en amortiguar las respuestas inmunitarias, en la prevención de enfermedades autoinmunitarias y en tolerancia oral.

50 Las expresiones “linfocitos T reguladores naturales” o linfocitos T reguladores” como se utilizan en el presente documento se refieren a linfocitos Treg, Th3 y Tr1. Los Treg se caracterizan por la expresión de marcadores de superficie CD4, CD25, CTLA4 y el factor de transcripción Foxp3. Los linfocitos Th3 y Tr1 son linfocitos T CD4^+ , que se caracterizan por la expresión de $\text{TGF-}\beta$ (linfocitos Th3) o IL-10 (linfocitos Tr1), respectivamente.

55 Las expresiones “linfocito T CD8^+ ” o “CTL” como se utiliza en el presente documento se refiere a linfocitos T citotóxicos que reconocen y destruyen células degeneradas, neoplásicas o malignas así como el tejido y células, que están infectados con microorganismos o parásitos. Los linfocitos T CD8^+ también se llaman linfocitos T CD4-CD8^+ o linfocitos Th-1.

La expresión “célula presentadora de antígeno (APC)” como se utiliza en el presente documento se refiere a células, que son capaces de capturar , procesar polipéptidos y presentar fragmentos de estos polipéptidos (epítomos) al sistema inmunitario en asociación con proteínas del MHC clase I y clase II. Particularmente, la expresión “célula presentadora de antígeno (APC)” como se utilizan en el presente documento se refiere a APC profesionales tales como células dendríticas, monocitos, macrófagos y células B, pero también a APC no profesionales tal como neutrófilos, fibroblastos pero también células epiteliales vasculares y distintas células epiteliales, mesenquimáticas así como células de la glía del cerebro.

La expresión “urea depuesta” como se utiliza en el presente documento se refiere a urea que se ha pre-tratado por varias condiciones de incubación. En particular, el pre-tratamiento de la urea puede comprender la incubación de urea a aproximadamente -20 °C a aproximadamente 40 °C, preferentemente a aproximadamente la temperatura ambiente durante varias horas, días, semanas o meses y/o el calentamiento de la urea a temperaturas en el intervalo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 100 °C durante varios minutos, horas o días. La expresión “urea depuesta” como se utilizan en el presente documento se refiere preferentemente a una solución de urea que tienen una concentración aumentada de cianato en comparación con la urea no depositada. preferentemente, la expresión “urea depuesta” como se utiliza en el presente documento se refiere a una solución de urea que tiene una concentración de cianato en el intervalo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 50 mmol/l, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 o aproximadamente 0,9 a aproximadamente 50 mmol/l, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mmol/l, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 3 a aproximadamente 45 mmol/l, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mmol/l , más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 mmol/l, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 mmol/l, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 mmol/l.

La expresión “dominio de transducción proteica (PTD)” como se utiliza en el presente documento se refiere a dominios y cadenas de proteínas que son capaces de translocalizar dichas proteínas en el citoplasma de las células. Por lo tanto, los dominio se transducción proteica promueve la transferencia de proteínas extracelulares en el citoplasma de una célula y en particular en la ruta endógena de APC del procesamiento, a saber la ruta del MHC clase I. En particular, la expresión “domino de transducción proteica (PTD) como se utiliza en el presente documento se refiere a

- (i) dominios de transducción proteica naturales tales como PTD ricos en arginina incluyendo Tat (transactivador de transcripción) de VIH, Antp (antenapedia de Drosophila y PTD-5).
- (ii) secuencia de señal hidrófoba tal como la secuencia de señal de factor de crecimiento de fibroblastos, al que se también se hace referencia como secuencia de transducción de membrana (MTS).
- (iii) dominios de transducción proteica sintéticos, tales como homopolímeros de lisina, ornitina y arginina, y
- (iv) dominios de translocación de membrana de toxinas bacterianas tales como la toxina de la difteria y la toxina tetánica.

Los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que los polipéptidos incubados con cianato pueden transferirse a las células en presencia de urea con una alta eficacia. Además, los inventores de la presente invención descubrieron que los polipéptidos incubados con cianato inducen una significativa presentación de epítomos en proteínas de MHC clase I y II en células inmunitarias en presencia de urea y por lo tanto son capaces de sensibilizar, reactivar y expandir linfocitos T específicos de polipéptidos (por ejemplo linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺) eficazmente.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la transferencia de polipéptidos dentro de células presentadoras de antígenos (APC), que comprende las siguientes etapas:

- a) Incubar polipéptidos en una solución que comprende iones de cianato, en la que los iones de cianato están presentes a una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mmol/l, a temperaturas en el intervalo de aproximadamente la temperatura ambiente a aproximadamente 96 °C y durante un tiempo de aproximadamente varios minutos a varios días, y
- b) Incubar células presentadoras de antígeno (APC) con los polipéptidos de la etapa (a) en presencia de urea.

El procedimiento de acuerdo con la invención que se puede utilizar para infiltrar polipéptidos en células presentadoras de antígenos (APC) tal como las células dendríticas (por ejemplo, células de Langerhans), monocitos, macrófagos, linfocitos B pero también células epiteliales vasculares y distintas células epiteliales, mesenquimáticas así como células de la microglía del cerebro.

Otro procedimiento de acuerdo con la presente invención es un procedimiento es un procedimiento para la detección de células inmunitarias específicas de polipéptidos, que comprende las siguientes etapas:

- a) Incubar los polipéptidos en una solución que comprende iones de cianato, en la que los iones de cianato están presentes a una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mmol/l, a temperaturas en el intervalo de aproximadamente la temperatura ambiente a aproximadamente 96 °C y durante

un tiempo de aproximadamente varios minutos a varios días, y

b) Incubar los cultivos celulares que contienen APC o los fluidos corporales que contienen APC con los polipéptidos de la etapa (a) en presencia de urea,

5 c) Incubar los cultivos que contienen APC o los fluidos corporales que contienen APC obtenidos de acuerdo con la etapa b) con células inmunitarias o fluidos corporales que contienen células inmunitarias,

d) Detectar simultánea y/o específicamente y/o cuantificar distintos subtipos de células inmunitarias específicas de polipéptidos que son específicas contra los polipéptidos de la etapa a).

10 El fluido corporal que contiene APC es preferentemente sangre completa y/o líquido cefalorraquídeo. En una realización del procedimiento para la detección de acuerdo con la presente invención el cultivo celular que contiene APC comprende una población de PBMC (leucoferesato), células monocíticas aisladas y/o una población de APC distinta, preferentemente que comprende células dendríticas (células de Langerhans) monocitos, macrófagos y/o linfocitos B. La expresión "cultivos celulares que contienen APC" como se utiliza en el presente documento por lo tanto no solo significa células que comprenden APC mantenidas y multiplicadas *in vitro* en un medio de cultivo, sino también poblaciones celulares tomadas de un probando, pacientes o un animal y contiene APC purificadas. Por ejemplo, la sangre u otro fluido corporal que contiene APC se puede tomar de un donante de sangre sano o un paciente. El fluido corporal se puede utilizar directamente en la etapa b) del procedimiento de acuerdo con la invención o de poblaciones celulares que contienen APC que se pueden purificar y después utilizarse. La purificación de poblaciones celulares que contienen APC de la sangre u otros fluidos corporales que contienen APC está en la experiencia de la técnica y es conocida por el experto en la técnica.

20 Después de incubar los cultivos celulares que contienen APC o los fluidos corporales que contienen APC con los polipéptidos carbamoylados en presencia de una solución de urea, las células se incuban con células inmunitarias o fluidos corporales que contienen células inmunitarias. Las células inmunitarias o los fluidos corporales que contienen células inmunitarias se obtienen preferentemente del mismo donante de sangre sano, paciente o animal del que se originaron los cultivos celulares o los fluidos corporales que contienen APC. De manera alternativa, las células inmunitarias o fluidos corporales que contienen células inmunitarias se obtienen de donantes de sangre sanos, pacientes o animales que tienen un patrón del MHC compatible con los cultivos celulares o los fluidos corporales que contienen APC. Los fluidos corporales que contienen células inmunitarias específicas de polipéptidos pueden ser la sangre completa y/o líquido cefalorraquídeo. Las células inmunitarias específicas de polipéptidos pueden ser linfocitos T, preferentemente linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, linfocitos T CD4⁺CD8⁺, linfocitos T CD4⁺CD8^{dim} y/o linfocitos T reguladores CD4⁺ y/o pueden ser otras poblaciones de células inmunológicas, preferentemente linfocitos T NK CD56⁺CD8⁺ y CD56-CD57⁺CD8⁺ y/o linfocitos NK CD56⁺.

Los procedimientos para obtener y purificar APC definidas y poblaciones de células inmunitarias están en la experiencia de la técnica.

35 El cultivo celular que contienen APC o fluido corporal que contiene APC, por ejemplo, sangre completa, líquido cefalorraquídeo o PBMC utilizadas en la etapa b) puede contener ya las poblaciones de células inmunitarias que se van a detectar. En este caso, no es necesario añadir células inmunitarias o fluidos que contienen células inmunitarias en la etapa c).

40 La incubación en la etapa c) es aproximadamente de 1 min a aproximadamente 240 horas o más larga, preferentemente aproximadamente de 2 a aproximadamente 6 horas o aproximadamente de 6 a aproximadamente 12 horas o aproximadamente de 12 a aproximadamente 36 horas, o aproximadamente de 36 a 72 horas, o de 72 a aproximadamente 240 horas en condiciones de cultivo adecuadas, por ejemplo a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5 a 8 % de CO₂ en un medio para linfocitos T (RPMI 1640 con 2 a 10 % de suero humano o suero fetal bovino (FCS) inactivado por calor (30 min, 56 °C), 2 mM de glutamina y 100 mg/ml de kanamicina o gentamicina (todos los componentes de PanSystems, Aidenbach). Sin embargo, se pueden utilizar también otras condiciones adecuadas conocidas en la técnica con variaciones en la composición del medio, temperatura, humedad del aire, tiempo de incubación.

45 La detección de poblaciones definidas de células inmunitarias específicas de polipéptidos se basa en el hallazgo de que después del reconocimiento específico de los polipéptidos que se presentan en conjunto con las proteínas del MHC de las clases II y/o I en la superficie de APC, las células inmunitarias presentan un aumento de expresión de las citocinas características, especialmente IFN- γ y/o TNF y/o IL-2, o IL-4 y/o IL-5, o IL-17 o IL-10 y/o TGF- β . Como resultado de un análisis conjunto de las proteínas de superficie que son características de poblaciones de células inmunitarias definidas, y de citocinas, puede detectarse la presencia y/o concentración de poblaciones definidas de células inmunitarias específicas de polipéptido en una mezcla de diferentes poblaciones de células inmunitarias. La detección y cuantificación en la etapa d) por tanto tiene lugar mediante la detección simultánea de proteínas de superficie y citocinas.

50 Por lo tanto, en una realización del procedimiento de detección de acuerdo con la presente invención la detección y/o la cuantificación se lleva a cabo mediante la detección de marcadores de superficie específicos para las células inmunitarias específicas de polipéptidos y la producción de citocinas marcadoras tales como IL-2, TNF, IFN- γ , IL-4 o IL-5, IL-10, TGF- β . La detección y/o cuantificación se puede llevar a cabo por ELISA, ELISpot o análisis FACS. De manera alternativa, la detección y/o cuantificación se lleva a cabo mediante la medición de la expresión de superficie

60

transitoria de CD107a.b o mediante la proliferación de linfocitos T, o, si por ejemplo se detectan o cuantifican linfocitos T CD8⁺, por medio de un ensayo de liberación de cromo clásico o un procedimiento adecuado no radioactivo.

5 Además, la detección de poblaciones celulares definidas mediante proteínas de superficie específicas se puede llevar a cabo, por ejemplo mediante CD4 para los linfocitos T auxiliares, CD8 para linfocitos T citotóxicos, CD4 y CD8 para linfocitos T CD4⁺CD8^{dim} y CD4⁺CD8⁺, CD56 para linfocitos NK, CD4 y CD25 para linfocitos Treg y CD56 y CD8 o CD57 y CD8 para distintas poblaciones de linfocitos T NK. Los estados específicos de las poblaciones celulares (células intactas frente a activadas frente a células de memoria) y los grados de capacidad de activación se pueden determinar adicionalmente para detectar proteínas de superficie adicionales (por ejemplo, CD69, CD45R0, CD45RA, CCR7) y proteínas intracelulares (por ejemplo, granzima, perforina, FoxP3), citocinas intracelulares (por ejemplo, IL-2, TNF, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β) o proteínas expuestas en la superficie tales como CD107a.b. Por lo tanto, es posible una detección específica de poblaciones celulares específicas de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. Los marcadores de superficie característicos enumerados para las poblaciones celulares definidas se conocen en la técnica así como la detección y caracterización de diferentes poblaciones de células inmunitarias utilizando tecnología FACS por ejemplo.

10 La activación específica de las células inmunitarias se detecta después de su incubación con los cultivos celulares que contienen APC o los fluidos corporales que contienen APC que se obtienen de acuerdo con la etapa b) midiendo el aumento de producción de cualquier citocina de las células inmunitarias activadas. Por ejemplo, los linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, linfocitos T CD4⁺CD8^{dim} y CD4⁺CD8⁺, linfocitos NK CD56⁺, y linfocitos T NK CD56⁺CD8⁺ o CD57⁺CD8⁺ aumentan la producción de IFN- γ después de la estimulación específica, mientras que los linfocitos T auxiliares CD4⁺ del tipo T auxiliar 2 (Th-2) muestran un aumento de las citocinas IL-4 e IL-5. Los linfocitos T reguladores (linfocitos Treg, Th3, Tr1) muestran un aumento de la expresión de IL-10 y/o TGF- β . Las citocinas producidas pueden determinarse simplemente por procedimientos conocidos en la técnica sea intracelularmente o después de la secreción en el sobrenadante utilizando, en algunos casos, procedimientos disponibles en el mercado, por ejemplo FACS (por ejemplo, por tinción de citocinas intracelulares, o el ensayo de secreción de citocinas, ELISA, o tecnología ELISpot. La detección también es posible por medio de otras citocinas producidas después de la activación específica de células inmunitarias u otros marcadores producidos.

20 Las células inmunitarias activadas se pueden determinar y caracterizar por ejemplo utilizando citometría de flujo (FACS: Clasificación celular activada por fluorescencia). Este procedimiento permite medir la intensidad de fluorescencia de células individuales en una población celular mixta utilizando un citómetro de flujo. El análisis citométrico de flujo de las células se hace entonces utilizando un sistema FACS por ejemplo un citómetro de flujo FACS Epics XL MCL y el software Expo 32 (Becton Coulter) o el citómetro de flujo FACS Canto II y el software Diva 6.1.1 (Beckton Dickinson).

30 El acoplamiento de fluorescencia, por ejemplo, con R-ficoeritrina (R-PE), peridín-clorofila c (PerCP), fluoresceína (FITC), Rojo Texas (TX), alofocianina (APC), amciano, Azul Pacífico, tándem PE-TX, tándem PE-Cy5, PE-Cy7 o tándem APC-Cy7, diversos fluorocromos Alexa, anticuerpos primarios o secundarios son adecuados para detectar las proteínas de superficie características y las citocinas descritas anteriormente utilizando tecnología FACS y están disponibles en el mercado (por ejemplo, en Becton Dickinson, Dako, Coulter, eBioscience, Biolegend). Además del procedimiento FACS también son adecuados otros procedimientos adecuados para la determinación de la producción de células inmunitarias, por ejemplo, procedimientos ELISA, procedimientos ELISpot, biosensores y perfil de expresión para detectar células inmunitarias específicas de polipéptidos. Estos procedimientos se conocen en la técnica.

Otro procedimiento de acuerdo con la presente invención es un procedimiento para la sensibilización, expansión y/o reactivación de linfocitos T específicos de polipéptidos que comprenden las siguientes etapas:

- 45 a) Incubar polipéptidos en una solución que comprende iones cianato, en la que los iones cianato están presente en una concentración en el intervalo desde aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mmol/l, a temperaturas en el intervalo desde aproximadamente la temperatura ambiente a aproximadamente 96 °C y durante un tiempo desde varios minutos a varios días, y
- 50 b) Incubar las células presentadoras de antígenos (APC) con los polipéptidos de la etapa a) en presencia de urea y en ausencia o presencia de sustancias inmunomoduladoras, en el que los linfocitos T específicos de polipéptidos son linfocitos T CD4⁺ y/o linfocitos T CD8⁺.

El procedimiento para la sensibilización, expansión y/o reactivación de los linfocitos T específicos de polipéptidos se pueden llevar a cabo *in vivo*, *in vitro* y/o *ex vivo*.

55 Las células incubadas en la etapa b) pueden ser APC y/o linfocitos T que se van a purificar de la sangre, células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) u otro fluido corporal que comprende dichas APC y/o linfocitos T. De manera alternativa, la sangre, PBMC u otro fluido corporal que comprende APC y/o linfocitos T se utilizan directamente en la etapa b). La sangre, PBMC u otro fluido corporal que comprende APC y/o linfocitos T pueden ser una muestra obtenida previamente de un paciente humano o animal.

En una realización del procedimiento de sensibilización, expansión y/o reactivación de los linfocitos T específicos de polipéptidos de acuerdo con la presente invención, la etapa de incubación b) se lleva a cabo varias veces, preferentemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o incluso más veces. La repetición de la etapa b) es preferido en particular por un procedimiento de expansión de linfocitos T específicos de polipéptidos.

- 5 Todos los procedimientos de acuerdo con la presente invención se basan en la enseñanza inventiva de que la transferencia de polipéptidos en las células está mejorada significativamente si los polipéptidos pre-tratados con cianato se incuban con dichas células en presencia de urea. Por lo tanto, la siguiente enseñanza se refiere a todos los procedimientos de acuerdo con la presente invención como se ha descrito anteriormente.

10 Los polipéptidos pueden producirse sintéticamente o expresarse en distintas células por medio de sistemas de expresión procarióticos o eucarióticos. Ejemplos de sistemas de expresión son bacterianos tales como *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Streptococcus cremoris* o *Streptococcus lividans*, células de levadura tales como *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, o *Yarrowia lipolytica*, células de insecto tales como de *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombux mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, o *Trichoplusia ni*, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células de riñón de mono (COS), o células vegetales.

15 Los polipéptidos que se utilizan se pueden purificar por procedimientos biológicos moleculares convencionales, por ejemplo, por disrupción celular, digestión de ácidos nucleicos, procedimientos para concentrar proteínas, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel, o en combinación como procedimientos de desnaturalización polipeptídica, por ejemplo, precipitación ácida, tratamiento con urea, tratamiento con álcalis, tratamiento por calor, tratamiento con dodecilsulfato sódico (SDS) o sonicación. Estos procedimientos para purificar los polipéptidos pueden combinarse adicionalmente de una manera arbitraria.

20 Los polipéptidos pueden ser sintéticos o polipéptidos de origen no natural o pueden existir en seres vivos arbitrarios, por ejemplo, en mamíferos tales como seres humanos, primates, ratones, ratas, cabras, ovejas, vacas, cerdos o en cualquier animal, parásitos, microorganismos o virus. Sin embargo, también se originan de plantas y algas. Además, pueden originarse de proteínas priónicas.

25 Los polipéptidos que se van a utilizar en la etapa a) de los procedimientos de acuerdo con la presente invención se pueden dividir en dos grupos con respecto a su propiedad intrínseca para penetrar en el citosol de las células, en particular las APC.

30 El primer grupo de polipéptidos tiene una propiedad intrínseca para penetrar en el citosol de las células, en particular las APC. Dichas proteínas se procesan por lo tanto y se presentan mediante la ruta del MHC clase I sin ninguna ayuda adicional. Dicha propiedad intrínseca puede producirse por un dominio de transducción (PTD) de dicha proteína. Dicho dominio de transducción puede ser un dominio de transducción que existe naturalmente (PTD) o un dominio de transducción añadido recombinantemente. Ejemplos de proteínas que tienen un dominio un dominio de transducción de origen natural son el transactivador de transcripción de VIH (Tat) y proteína Rev, VP22 de virus del herpes simple y la homeoproteína antenapedia (antp) de *Drosophila* (Sugita y col. (2008) Br J Pharmacol. 153: 1143-1152). Sin embargo dicha propiedad intrínseca también puede producirse por una función intrínseca de una cadena específica del polipéptido tal como la cadena pesada de la toxina tetánica. Otros ejemplos para los polipéptidos que tienen una función intrínseca para penetrar en el citosol de las células son toxinas tales como la toxina diftérica.

35 Aquí, la translocalización está mediada por un "domino T" o de translocalización. Además, se ha demostrado que una secuencia de señal del factor de crecimiento de fibroblastos, a la que también se hace referencia como secuencia de transducción de membrana (MTS), es otro tipo de péptidos de penetración en la célula (CPP). Además, el acoplamiento de polipéptidos a micropérlas, anticuerpos, lípidos, proteínas de choque térmico y dominios de transducción proteica (PTD) ricos en arginina confiere el suministro a la maquinaria de procesamiento de HLA clase I de las APC.

40 El segundo grupo de polipéptidos no tiene la propiedad intrínseca para penetrar en el citosol de las células, en particular las APC. Dichas proteínas no penetran en el citosol de la APC sin ayuda pero se mantienen en compartimentos endosómicos/ endolisosómicos de dichas APC. En consecuencia, dichas proteínas normalmente no están procesadas ni se presentan mediante la ruta del MHC clase I sino que se procesan y presentan mediante la ruta del MHC clase II solamente. El segundo grupo incluye la vasta mayoría de las proteínas humanas, microbianas, víricas, animales o vegetales de origen natural o recombinantes y en particular los polipéptidos solubles respectivos y polipéptidos de lisados de células, tejidos, bacterias, virus y parásitos.

45 En una realización de la presente invención, los procedimientos de la presente invención se llevan a cabo con polipéptidos del primer grupo que se ha descrito anteriormente y por tanto con polipéptidos que tienen la propiedad intrínseca para penetrar en el citosol de las células, en particular en las APC. Por lo tanto, los procedimientos de la presente invención promueven adicionalmente la transferencia de los polipéptidos en el citosol de las APC. Por lo tanto, la eficacia de la transferencia de polipéptidos puede estar aumentada para dichos polipéptidos por los procedimientos de acuerdo con la presente invención.

En otra realización de la presente invención los procedimientos de la presente invención se llevan a cabo con polipéptidos del segundo grupo que se ha descrito anteriormente y por lo tanto con polipéptidos que no tiene naturalmente la propiedad intrínseca para penetrar en el citosol de las células, en particular las APC. Para dichos polipéptidos, la presente invención proporciona un procedimiento para una transferencia muy eficaz de polipéptidos en el citosol de las APC.

Los polipéptidos preferidos del segundo grupo son todo tipo de polipéptidos que tienen epítomos de linfocitos T pero carecen de (i) un dominio de transducción proteica natural y/o (ii) cualquier vector o dominio unido a dicho polipéptido recombinantemente que produce la translocalización del polipéptido en las células, en particular las APC.

Ejemplos de polipéptidos del segundo grupos son proteína microbianas, en particular proteínas del

- (i) Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tales como gp120, gp160, p24, gag, polimerasa, transcriptasa inversa, y nef.
- (ii) Virus de Epstein-Barr (EBV) tal como EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNA4, EBNA6, BZLF1, BMLF1, BMRF1, BHRF1, BARF0, BRLF1, BILF4, gp85, gyp110, gp220/350, VCA p150, EBNA-LB, LMP-1 y LMP-2 (por ejemplo, las descritas en Khanna y col. (2000), Annu. Rev. Microbiol. 54:19-48),
- (iii) Citomegalovirus (CMV) tal como UL123 (IE1), UL122 (IE-2), UL83 (pp65), UL82, HL99, UL28, UL33, UL37, US3, UL94, UL16, UL55(gB), UL85, UL25, US18, UL45 y UL32 (pp150) (por ejemplo, las que se describen en Crough y col. (2009) Clin Microbiol Rev. 22:76-98),
- (iv) Virus de varicela Zoster (VZV) tales como ORF1, ORF4, ORF10, ORF14, ORF29, ORF62 y ORF68 (gE),
- (v) *M. tuberculosis* tales como CFP10, ESAT6, TB7.7, TB37.6, MPT63
- (vi) *Borrelia burgdorferi* tales como OSP A y OSP C
- (vii) Virus de hepatitis B tales como HBsAg y HBcAg, y
- (viii) Adenovirus tales como AdV5 Hexon

Además, las proteínas humanas son polipéptidos de dicho segundo grupo, por ejemplo, antígenos tumorales tales como el antígeno específico de próstata (PSA), HER-2/neu, MUC-1, p53 sobre-expresado de tipo silvestre o mutado puntualmente, antígeno MAGE y CEA (antígeno carcinoembrionario). También son polipéptidos preferidos de dicho segundo grupo las proteínas que representan dianas relevantes de los linfocitos T autoagresivos en enfermedades autoinmunitarias. Ejemplos de dichas proteínas con respecto a la enfermedad autoinmunitaria de esclerosis múltiple son la proteína básica mielina (MBP), glicoproteína de mielina oligodendrocítica (MOG), proteína proteolipídica (PLP), Mielina, proteína de fusión MBP/PLP (MP4), glicoproteína asociada a mielina (MAG). Ejemplos de dichas proteínas con respecto a la enfermedad autoinmunitaria de diabetes tipo I son insulina B, pre-pro-insulina (PPI), IA-2, GAD65, IGRP, cd4, cromogranina A (ChgA) (por ejemplo, las que se describen en Velthuis y col. (2010) Diabetes). También se prefiere el uso de fragmentos de las proteínas mencionadas anteriormente para los procedimientos de acuerdo con la presente invención.

Para determinar si un polipéptido es un polipéptido del primer o el segundo grupo como se ha descrito anteriormente, se puede ensayar la capacidad de penetrar en el citosol de células eucariotas, en particular de APC, por ejemplo, por medio de microscopía de fluorescencia, en el que los compartimentos celulares y los polipéptidos pueden conjugarse fluorescentemente. Los procedimientos respectivos son conocidos por un experto en la técnica y se describen por ejemplo en Kaplan y col. (Journal of Controlled Release 102 (2005) 247-253) y en el documento WO 99/55899.

Los polipéptidos de la etapa a) en los procedimientos de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar en cualquiera concentración arbitraria. Preferentemente, la concentración se basa en el intervalo desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 200 µg/ml o más, en el intervalo desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 µg/ml, en el intervalo desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,4 µg/ml, en el intervalo de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 2 µg/ml, en el intervalo desde aproximadamente 2 a aproximadamente 10 µg/ml, en el intervalo desde aproximadamente 10 a aproximadamente 50 µg/ml o en el intervalo desde aproximadamente 50 a aproximadamente 200 µg/ml. Más preferidas son las concentraciones de polipéptidos desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 µg/ml, más preferentemente en el intervalo desde aproximadamente 1 a aproximadamente 40 µg/ml, desde aproximadamente 3 a aproximadamente 30 µg/ml, o desde aproximadamente 5 a aproximadamente 20 µg/ml. Especialmente preferida es una concentración de polipéptidos de aproximadamente 10 µg/ml.

El pre-tratamiento de los polipéptidos con cianato en la etapa a) de los procedimientos de acuerdo con la presente invención da como resultado la carbamoilación de los grupo amino de los polipéptidos. Una carbamoilación es la transferencia del carbamoilo de una molécula que contiene carbamoilo (por ejemplo, el fosfato de carbamoilo) a un resto receptor tal como un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo sulfhidrilo, un grupo fosfato, un grupo hidroxilo o un grupo imidazol. Un carbamoilo es un radical acilo que tiene la estructura NH₂-CO-. Sin embargo la carbamoilación también puede producirse con un grupo tiocarbamoilo que tiene la estructura NH₂-CS-.

La carbamoilación del polipéptido de acuerdo con la presente invención puede ser una carbamoilación de un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo sulfhidrilo, un grupo fosfato, un grupo hidroxilo o un grupo imidazol. Preferentemente la carbamoilación de los polipéptidos de acuerdo con la presente invención es una carbamoilación

de los grupos amino primarios del polipéptido, en particular del grupo amino terminal y el grupo amino épsilon de los restos de lisina. De manera alternativa o además, pueden estar carbamoilados el grupo hidroxilo de la tirosina, el grupo sulfhidrilo de la cisteína, el grupo carboxilo del ácido aspártico o glutámico y el grupo imidazol de la histidina.

5 La reacción de carbamoilación se puede llevar a cabo incubando polipéptidos en una solución que comprende cianato. En una realización de la presente invención la concentración de cianato está en el intervalo desde aproximadamente 500 mmol/l a aproximadamente 1000 mmol/l. Más preferidas son las concentraciones de cianato en el intervalo desde aproximadamente 1 mmol/l a aproximadamente 1000 mmol/l, más preferentemente en el intervalo desde aproximadamente 5 mmol/l a aproximadamente 900 mmol/l, desde aproximadamente 10 mmol/l a aproximadamente 800 mmol/l, desde aproximadamente 20 mmol/l a aproximadamente 700 mmol/l o desde aproximadamente 50 mmol/l a aproximadamente 600 mmol/l. En particular, se prefieren concentraciones de cianato desde aproximadamente 100 mmol/l a aproximadamente 500 mmol/l, tales como una concentración de cianato de aproximadamente 100 mmol/l, aproximadamente 150 mmol/l, aproximadamente 200 mmol/l, aproximadamente 250 mmol/l, aproximadamente 300 mmol/l, aproximadamente 350 mmol/l, aproximadamente 400 mmol/l, aproximadamente 450 mmol/l o aproximadamente 500 mmol/l.

15 En una realización la incubación puede producirse a temperaturas en el intervalo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 96 °C. La incubación a una temperatura baja necesita un tiempo de incubación más largo y la incubación a una temperatura alta necesita un tiempo de incubación más corto, en particular porque los polipéptidos se degradan si se incuban a altas temperaturas durante mucho tiempo. Se prefiere una temperatura de incubación en el intervalo desde aproximadamente la temperatura ambiente a aproximadamente 60 °C, en el intervalo desde aproximadamente 30 °C a 50 °C o en el intervalo desde aproximadamente 37 °C a 45 °C. Se prefiere especialmente una temperatura de incubación de aproximadamente 40 °C. Por lo tanto se prefiere un tiempo de incubación de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 24 h o de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas. Especialmente se prefiere un tiempo de incubación de aproximadamente 1 hora.

25 En una realización de la presente invención el polipéptido se incuba para la carbamoilación en una solución de urea que comprende cianato. Preferentemente, la concentración de urea de dicha solución de urea está en el intervalo desde aproximadamente 0,01 mol/litro a aproximadamente 8 mol/litro, desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 mol/litro, desde aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 mol/l o desde aproximadamente 5 a aproximadamente 8 mol/litro.

30 La concentración de cianato de una solución de urea recién preparada es menor de 0,2 mmol/l. Sin embargo, de acuerdo con la etapa a) de los procedimientos de acuerdo con la presente invención los polipéptidos tienen que incubarse en una solución que tiene una concentración de cianato de al menos 1 mmol/l. Se prefiere una solución que comprende urea con una concentración de cianato en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 mmol/l, desde aproximadamente 2 a aproximadamente 45 mmol/l, desde aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mmol/l, desde aproximadamente 10 a aproximadamente 40 mmol/l, desde aproximadamente 20 a aproximadamente 40 mmol/l o desde aproximadamente 30 a aproximadamente 40 mmol/l.

35 Para aumentar la concentración de cianato de una solución de urea hay varias posibilidades.

40 En una realización de la presente invención la concentración de cianato en la solución de urea aumenta por la incubación de dicha solución de urea en condiciones de incubación específica. La urea en solución está en equilibrio con cianato amónico. La forma que reacciona con los grupos amino de polipéptidos es el ácido isociánico. El ácido isociánico reacciona con el extremo amino de los polipéptidos y las cadenas laterales de restos de lisina y arginina. Por lo tanto, la carbamoilación de polipéptidos en una solución de urea se puede aumentar aumentando la concentración de cianato en dicha solución de urea y por tanto mediante una manipulación de la reacción de equilibrio de la urea y el cianato amónico. Dicha reacción de equilibrio puede influenciarse por calor y/o por el tiempo de incubación.

45 La acumulación de cianato en soluciones acuosas de urea se ha analizado en detalla por Marier y colegas (Marier y col. (1964) *Analytical Biochemistry* 7:304). Describieron que se alcanzaba un nivel máximo de cianato a 25 °C en aproximadamente 60 días. A una concentración de urea determinada, el nivel máximo de cianato a 25 °C era aproximadamente del 60 % de la obtenida a 38 °C (7 días) y aproximadamente un 23 % del obtenido a 85 °C (50 min).

50 Para el aumento de la concentración de cianato de la solución de urea, la solución de urea se puede incubar aproximadamente varios minutos a varias horas, días, semanas o meses, La incubación se puede producir a temperaturas en el intervalo de aproximadamente -20 °C a aproximadamente 100 °C, desde aproximadamente la temperatura ambiente a aproximadamente 98 °C, desde aproximadamente 37 °C a aproximadamente 96 °C, desde aproximadamente 40 °C a aproximadamente 96 °C, o desde aproximadamente 70, 80 o aproximadamente 90 a aproximadamente 96 °C. Para aumentar la concentración de cianato es evidente que la incubación a baja temperatura necesita un tiempo de incubación largo, mientras que la incubación a alta temperatura necesita un tiempo de incubación más corto. Por ejemplo la incubación a -20 °C necesita una incubación de aproximadamente varias semanas a varios meses, mientras que la incubación a 96 °C puede necesitar un tiempo de incubación de aproximadamente varios minutos, hasta aproximadamente 1 hora o varias horas.

Si una solución de urea pre-tratada como se ha descrito anteriormente se utiliza en la incubación de la etapa a) de los procedimientos de acuerdo con la presente invención, la incubación de la etapa A) se produce preferentemente a temperaturas desde aproximadamente 30 °C a aproximadamente 70 °C, o desde aproximadamente 37 °C a aproximadamente 40 °C. Por lo tanto, se prefiere un tiempo de incubación de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 48 horas. Sin embargo, es más preferido un tiempo de incubación de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 24 horas.

En otra realización de la presente invención la concentración de cianato de la solución de urea aumenta durante la etapa de incubación a) de los procedimientos de acuerdo con la presente invención. Para aumentar la concentración de cianato es evidente, que la incubación a baja temperatura necesita un tiempo de incubación largo, mientras que la incubación a temperatura alta necesita un tiempo de incubación más corto. Sin embargo, la degradación del polipéptido a temperaturas más altas también tiene que considerarse. Se prefieren tiempos de incubación por ejemplo, desde aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 4 horas, o desde aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas. Se prefiere especialmente un tiempo de incubación de aproximadamente 1 hora a una temperatura de 96 °C. También se prefieren tiempos de incubación desde aproximadamente 1 h a 3 h, preferentemente 2 h a temperaturas de aproximadamente 60 a aproximadamente 90 °C, se prefiere especialmente de aproximadamente 70 a aproximadamente 80 °C.

Las condiciones de incubación adecuadas para aumentar la concentración de cianato de una solución de urea sola o una solución de urea que comprende polipéptidos que se pueden identificar midiendo la concentración de cianato. Los procedimientos para la medición de la concentración de cianato de las soluciones se conocen en la técnica por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Marier y col. (1964) *Analytical Biochemistry* 7:304).

El valor del pH de la etapa a) en los procedimientos de acuerdo con la presente invención es preferentemente desde aproximadamente 3,0 a aproximadamente 9,0 más preferentemente aproximadamente 3,9, 6,8 u 8,7. En particular, la carbamoylación de los grupos fosfato puede aumentarse aumentando el valor del pH. Sin embargo, la carbamoylación de los grupos e lisina se produce preferentemente a un valor de pH ácido.

Se describe en el presente documento la carbamoylación del polipéptido que se consigue por estrategias para la carbamoylación cuantitativa de polipéptidos descrita por Angel y colegas (Angel y col. (2007) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21:1623). En consecuencia, los polipéptidos se disuelven en 100 µl de urea 8 M, 200 mM de Tris -HCl, pH 7,4. Esta solución se reduce con 20 mM de ditioneitol (DTT) durante 2 horas a 50 °C, seguido por carbamidometilación con 45 mM de yodoacetamida (IDA) a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de polipéptidos desnaturalizados, reducidos y alquilados se diluye 1:8 con 50 mM de bicarbonato amónico para ajustar la concentración de urea a 1 M y se incuban durante una noche a 37 °C. Tras la digestión, la solución se seca y se disuelve en 300 µl de urea 8 M, 200 mM de Tris-HCl, pH 8,5. Después se revuelven las muestras hasta la solubilización completa y luego se incuban durante 4 h a 80 °C, con removido periódico de las muestras.

En una realización de la presente invención se añade cianato a la solución de urea de la etapa a) de los procedimientos de acuerdo con la presente invención. Por lo que, se prefieren las concentraciones finales de cianato en el intervalo de aproximadamente 1 mmol/l a aproximadamente 1000 mmol/l. Más preferidas son las concentraciones de cianato del intervalo desde aproximadamente 5 mmol/l a aproximadamente a aproximadamente 900 mmol/l, desde aproximadamente 10 mmol/l a aproximadamente 800 mmol/l, desde aproximadamente 20 mmol/l a aproximadamente 700 mmol/l o desde aproximadamente 50 mmol/l a aproximadamente 600 mmol/l. En particular, se prefieren concentraciones de cianato de aproximadamente 100 mmol/l a aproximadamente 500 mmol/l, tal como una concentración de cianato de aproximadamente 100 mmol/l, aproximadamente, 150 mmol/l, aproximadamente 200 mmol/l, aproximadamente 250 mmol/l, aproximadamente 300 mmol/l, aproximadamente 350 mmol/l, aproximadamente 400 mmol/l o aproximadamente 500 mmol/l.

En una realización de la presente invención la carbamoylación del polipéptido de la etapa a) se puede conseguir por incubación del polipéptido con un cianato alcalinometálico, un isocianato orgánico o un isotiocianato orgánico en un medio alcalino. El tiempo de incubación puede ser desde varios minutos a aproximadamente 36 horas, preferentemente desde aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 24 horas, preferentemente desde aproximadamente 1 hora a aproximadamente 12 horas. La temperatura de incubación es preferentemente de al menos aproximadamente 20 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 40 °C o aproximadamente 50 °C. El valor del pH es preferentemente desde 7 a 11, más preferentemente desde aproximadamente 8 a aproximadamente 10. Se prefiere el uso de cianato potásico, cianato sódico, cianato de plata o β-Estradiol 6 oxima (un conjugado de isocianato de fluoresceína en BSA).

Los polipéptidos carbamoylados se utilizaron entonces para la incubación de las células de la etapa b) de los procedimientos de acuerdo con la presente invención. La cantidad de polipéptido que se utiliza para aproximadamente 10⁶ células debería estar en el intervalo desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 µg y más, desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 µg, desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 µg, desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 µg, desde aproximadamente 10 a aproximadamente 50 µg o desde aproximadamente 50 a aproximadamente 200 µg de polipéptido.

En una realización de los procedimientos de acuerdo con la presente invención, la concentración de urea en la etapa

b) está en el intervalo desde aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,8 mol/l, preferentemente en el intervalo desde aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,2 mol/l, desde aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,1 mol/l, desde aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,01 mol/l, desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,2 mol/l, desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 mol/l o desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,8 mol/l. Sin embargo la concentración de urea puede ser también menor de 0,001 mol/l. Si existe un número total alto de células vivas y una relación de células vivas respecto a muertas en la que predominen las células vivas, la concentración de urea de la etapa b) debería ser menor de aproximadamente 0,8 mol/l, preferentemente menor de aproximadamente 0,3 mol/l. Más preferida es una concentración de urea en la etapa b) en el intervalo desde aproximadamente 0,01 mol/l a aproximadamente 0,1 mol/l, desde aproximadamente 0,015 mol/l a aproximadamente 0,09 mol/l, desde aproximadamente 0,02 mol/l a aproximadamente 0,08 mol/l, desde aproximadamente 0,025 mol/l a aproximadamente 0,07 mol/l, desde aproximadamente 0,03 mol/l a aproximadamente 0,06 mol/l o desde aproximadamente 0,035 mol/l a aproximadamente 0,05 mol/l. Se prefiere especialmente una concentración de urea en la etapa b) de aproximadamente 0,04 mol/l.

Además, la solución de urea de la etapa b) de los procedimientos de acuerdo con la presente invención puede comprender adicionalmente NaCl, preferentemente con una concentración en el intervalo de desde 0,25 mmol/l a aproximadamente 200 mmol/l, o desde aproximadamente 0,25 mmol/l a aproximadamente 75 mmol/l. De manera alternativa o además, la solución de urea de la etapa b) de los procedimientos de acuerdo con la presente invención puede comprender DTE o DTT, preferentemente con una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,25 nmol/l a aproximadamente 200 nmol/l, o desde aproximadamente 0,25 nmol/l a aproximadamente 75 nmol/l. Además, la concentración de DTE o DTT puede ser menor de 0,25 nmol/l o mayor de 200 nmol/l.

Los polipéptidos carbamoilados se incuban con las células en la etapa b) de la presente invención preferentemente durante aproximadamente 1 min a aproximadamente 240 horas o más, preferentemente durante aproximadamente 2 a aproximadamente 6 horas o durante aproximadamente 6 a aproximadamente 12 horas o durante aproximadamente 12 a aproximadamente 36 horas, o durante aproximadamente 36 a aproximadamente 240 horas.

En otra realización de los procedimientos de acuerdo con la presente invención la incubación de la etapa b) se lleva a cabo en un medio que comprende LPS. La actividad de los LPS en la etapa b) está preferentemente en el intervalo desde aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10000 U/ml, desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 8000 U/ml, desde aproximadamente 0,2 a aproximadamente 600 U/ml, desde aproximadamente 1 a 1000 U/ml, o desde aproximadamente 10 a aproximadamente 100 U/ml.

La incubación de los polipéptidos en la etapa a) da como resultado un aumento del peso molecular del polipéptido y/o un cambio del valor pK_i del polipéptido a un valor pK_i más ácido.

Para determinar si los polipéptidos tratados de la etapa a) están carbamoilados y presentan un aumento del peso molecular en comparación con los polipéptidos no carbamoilados, se pueden utilizar procedimientos convencionales conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, la comparación del peso molecular se puede analizar por una separación en una SDS-PAGE, un análisis de MS MALDI-TOF (espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo) o espectrometría NMR (espectroscopia de resonancia magnética nuclear).

La MS MALDI-TOF es una técnica, en la que un co-precipitado de una matriz absorbente de luz ultra violeta y una biomolécula se radia con pulso láser durante un nanosegundo. La mayoría de la energía láser se absorbe por la matriz, que evita una fragmentación no deseada de la biomolécula. Las biomoléculas ionizadas se aceleran en un campo eléctrico y entran en el tubo de vuelo. Durante el vuelo en este tubo, se separan las diferentes moléculas de acuerdo con su relación de masa a carga y alcanzan el detector a diferentes tiempos. De esta manera cada señal da lugar a una señal distinta. El procedimiento se utiliza para la detección y caracterización de biomoléculas, tales como las proteínas, péptidos, oligosacáridos y oligonucleótidos, con masas moleculares entre 400 y 350.000 Da.

Por ejemplo, la comparación de los valores pK_i se puede analizar por una electroforesis en dos dimensiones.

El procedimiento para detectar los linfocitos T específicos de polipéptido de acuerdo con la invención es adecuado para muchas aplicaciones científicas y médicas diferentes, por ejemplo, en análisis, diagnóstico y terapia. Utilizando el procedimiento de acuerdo con la invención, se pueden identificar diferentes poblaciones de células inmunitarias específicas de polipéptidos a la misma vez, por ejemplo, controlando la eficacia de vacunaciones terapéuticas y profilácticas para inducir células inmunitarias, para determinar la eficacia de tratamientos terapéuticos de enfermedades que implican células inmunitarias, para la exploración de la seguridad y eficacia de medicamentos que producen la eliminación de la anergia de las células inmunitarias o produciendo una supresión inmunitaria general, para controlar y diagnosticar inflamaciones crónicas que implican células inmunitarias, para el control y diagnóstico de células inmunitarias específicas de antígenos tumorales, para el control y diagnóstico de células inmunitarias que tiene un papel en el rechazo de trasplantes, para el diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias o para la selección específica de donantes de sangre para pruebas vacunales y el ensayo de tratamientos terapéuticos. Preferentemente, el procedimiento de detección de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo *in vitro* o *ex vivo*.

El procedimiento de acuerdo con la invención se puede utilizar en todos los vertebrados que tienen células inmunitarias, especialmente linfocitos T, especialmente en seres humanos, primates y roedores. Las células inmunitarias específicas de polipéptidos se pueden detectar y cuantificar por ejemplo en pacientes que padecen una infección microbiana, una enfermedad tumoral, una enfermedad inflamatoria crónica, un rechazo de un trasplante o una enfermedad autoinmunitaria o incluso de donantes de sangre sanos o participantes en ensayos terapéuticos y preventivos. Además, los linfocitos T específicos de epítipo se pueden detectar utilizando células obtenidas por el procedimiento de acuerdo con la invención, preferentemente utilizando APC obtenidas en primates u otros animales que posean células inmunitarias específicas de epítipo.

El procedimiento para detectar las células inmunitarias específicas de polipéptidos de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para el diagnóstico de infecciones microbianas, enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplantes y tumores.

Al contrario de los procedimientos para la detección de células inmunitarias específicas de polipéptidos que se habían descrito anteriormente, el procedimiento de acuerdo con la invención se caracteriza por las siguientes ventajas:

- (1) Se pueden detectar diferentes poblaciones de células inmunitarias específicas de polipéptido al mismo tiempo.
- (2) La detección de diferentes poblaciones de células inmunitarias específicas de polipéptidos se puede llevar a cabo con pequeños volúmenes de muestra.
- (3) La cantidad y calidad de las diferentes poblaciones de células inmunitarias específicas de polipéptidos se puede detectar al mismo tiempo.
- (4) El procedimiento se puede llevar a cabo fácilmente utilizando un equipamiento disponible en el mercado (lectores de FACS, ELISA, ELISpot) que se utiliza rutinariamente en muchos laboratorios de diagnóstico.
- (5) El procedimiento se puede utilizar universalmente para detectar células inmunitarias específicas de polipéptidos independientemente de la constelación HLA de la sangre del donante/paciente.
- (6) El procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la invención es adecuado para la determinación específica del paciente de la reactividad de los linfocitos contra un complejo polipeptídico. En este caso, no es necesario conocer las estructuras diana de estas células inmunitarias para llevar a cabo el procedimiento.
- (7) En comparación con los procedimientos de diagnóstico convencionales basados en la estimulación de linfocitos T con péptidos, proteínas solubles, lisados celulares, plásmidos de expresión o ARN, este procedimiento de detección de células inmunitarias específicas de polipéptidos se pueden utilizar universalmente, es fácil de manejar, es significativamente más barato, consume menos tiempo y es más sensible.

El procedimiento para la mejora de la sensibilización, expansión y/o reactivación de linfocitos T específicos de polipéptidos de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para aplicaciones diagnósticas, terapéuticas y preventivas. En particular, la reactivación de los linfocitos T específicos de polipéptido es la etapa más importante para la detección y/o cuantificación de linfocitos T específicos de polipéptido para fines diagnósticos. Por el contrario, la expansión de linfocitos T específicos de polipéptidos se pueden utilizar para la preparación de las células para la aplicación terapéutica o para fines de investigación.

Se ha descrito que los polipéptidos obtenidos en la etapa a) de acuerdo con los procedimientos de la presente invención se pueden utilizar para la sensibilización y reactivación de linfocitos T específicos de polipéptidos *in vivo*, por ejemplo, para el tratamiento o prevención de enfermedades. Se ha descrito que los polipéptidos obtenidos en la etapa a) de acuerdo con los procedimientos de la presente invención se pueden utilizar como una vacuna profiláctica o terapéutica. Por lo tanto, los polipéptidos de la etapa a) de acuerdo con los procedimientos de la presente invención se dializan preferentemente contra un tampón que contienen urea, preferentemente en el intervalo desde aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,2 mol/l, más preferentemente en el intervalo de 0,01 a aproximadamente 0,1 mol/l. Además, el tampón comprende preferentemente PBS. Más preferentemente dicho tampón no comprende iones bivalentes.

Se describe una composición farmacéutica que comprende los polipéptidos obtenidos en la etapa a) y preferentemente dializados como se ha descrito anteriormente en un tampón que contienen urea, preferentemente en el intervalo de desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,2 mol/l, más preferentemente en el intervalo desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 mol/l. Además, el tampón comprende preferentemente PBS. Más preferentemente dicho tampón no comprende iones bivalentes. Además, se describe que la composición farmacéutica comprende adyuvantes o sustancias inmunoestimulantes. Se describe que la composición farmacéutica es adecuada para su administración a un sujeto, preferentemente por inyección. Se describe que la composición farmacéutica se puede utilizar como una vacuna o para el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas y/o tumores.

Además, se describe en el presente documento el uso de células obtenidas de acuerdo con los procedimientos de acuerdo con la presente invención para diferentes aplicaciones. Las células tratadas utilizando los procedimientos de acuerdo con la invención se pueden utilizar en el área de investigación, diagnóstico y tratamiento y la prevención de enfermedades en animales y seres humanos. Por ejemplo, las APC obtenidas utilizando el procedimiento de

acuerdo con la invención son adecuadas para aplicaciones profilácticas o terapéuticas para combatir enfermedades infecciosas o tumores.

Adicionalmente se describe en el presente documento, el uso de los procedimientos de acuerdo con la presente invención en una pluralidad de diferentes aplicaciones científicas, medicinales y diagnósticas, por ejemplo, para

- 5 (a) el estudio de la importancia de estos polipéptidos en los procesos celulares,
- (b) la inducción de respuestas inmunitarias humorales y celulares en animales de experimentación y seres humanos,
- (c) obtención de sueros y anticuerpos para aplicaciones diagnósticas, terapéuticas y preventivas,
- 10 (d) inducción de respuestas inmunitarias adecuadas para proteger contra o para el tratamiento de infecciones microbianas o enfermedades tumorales.
- (e) vacunas profilácticas y terapéuticas, o
- (f) estimulación *ex vivo* de linfocitos T con fines diagnósticos, terapéuticos y preventivos,
- (g) la identificación de nuevas estructuras diana (epítomos) de linfocitos T citotóxicos.

Se describe en el presente documento, el uso de polipéptidos carbamoilados para la inducción de linfocitos T específicos en animales, especialmente en mamíferos, por ejemplo, en ratones, ratas, conejos, ovejas, cabras, caballos, ganado bovino, cerdos, perros, gatos y primates. Los polipéptidos carbamoilados también se pueden utilizar para la inducción respuestas inmunitarias celulares en seres humanos. En este caso, los polipéptidos carbamoilados se pueden administrar solos o en combinación con agentes inmunoestimulantes ("adyuvantes") o sustancias inmunomoduladoras (por ejemplo, lipopolisacáridos (LPS)) y/o en combinación con urea.

- 20 Especialmente, los adyuvantes adecuados y los agentes estimulantes inmunomoduladores para aumentar la eficacia de las vacunas/combinaciones vacunales descritos incluyen, por ejemplo: (1) adyuvantes tipo gel tales como las sales de aluminio (alumbre) tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio y fosfato cálcico; (2) adyuvantes microbianos tales como ácidos nucleicos bacterianos y oligodesoxinucleótidos (ODN) que incluyen motivos CpG (por ejemplo, CpG 1668 o CpG 2216; (Waibler y col. (2008), *Europ. J. Immunol.* 38:3127), endotoxinas tales como, por ejemplo, monofosforil lípido A, exotoxinas tales como por ejemplo el toxoide diftérico, del cólera, tetánico, enterotoxina termolábil de *E. coli* y muramil dipéptidos tales como, por ejemplo, MDP; (3) emulsiones oleosas y vacunas basadas en emulsiones, por ejemplo adyuvante incompleto de Freund (IFA), MF59, SAF y sistema adyuvante Ribit[™] (RAS), (Ribit Immunochem, Hamilton, Mont.); (4) adyuvantes particulares tales como, por ejemplo, complejos inmunoestimulantes (ISCOM), liposomas, polímeros PLG, microsferas y saponinas degradables biológicamente (QS-21), y adyuvantes sintéticos tales como polímeros en bloque no iónicos, análogos de muramil péptidos, polifosfaceno y polinucleótidos sintéticos y (5) citocinas, tales como por ejemplo interleucinas (IL-1, IL-2, IL-12 entre otros), factor estimulantes de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF) o factor estimulante de colonia de macrófagos (M-CSF), así como el factor de necrosis tumoral (TNF). Además de los adyuvantes, se pueden utilizar todas las sustancias que tengan un efecto inmunoestimulante para aumentar la eficacia de las composiciones vacunales descritas. Una lista de los adyuvantes disponibles adecuados se ha compilado y se puede recuperar por medio de la red de internet en la siguiente dirección (http://www.bvl.bund.de/nn_510850/EN/04_Plant_Protection_Products/03_PlantResistancelmproversAndAdjuvants/04_ListAdjuvants/ListAdjuvants_node.html_nnn=true).

- 40 Las combinaciones vacunales descritas (por ejemplo, de polipéptidos carbamoilados en conjunción con un componente de vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante) se añaden a las soluciones de dilución, tales como por ejemplo, agua, soluciones salinas, glicerol, etanol. Además, pueden estar presentes componentes accesorios adicionales tales como agentes humectantes y emulsionantes, sustancias tampón del pH y componentes similares en estas composiciones.

- 45 Las combinaciones vacunales se pueden combinar en regímenes de sensibilización-refuerzo con otras vacunas, por ejemplo, péptidos, proteínas recombinantes, ADN plasmídicos de expresión, virus recombinantes y bacterias y agentes patógenos vivos atenuados. Estas combinaciones vacunales están presentes habitualmente en forma inyectable, sea como soluciones o suspensiones líquidas.

- 50 La composición inmunogénica puede emulsionarse igualmente o incorporarse en liposomas con el fin de conseguir mejores propiedades adyuvantes en el sentido de un componente de vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición vacunal se puede administrar por vías de administración adecuadas. Las vías de administración posibles, entre otras, en este caso son la oral, tópica, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intra-articular, subcutánea, intranasal, intradérmica o dérmica. La composición vacunal se utiliza en la dosificación apropiada para la indicación. La determinación de una dosificación apropiada para distintos organismos está en la experiencia de la técnica. Las combinaciones vacunales descritas se pueden utilizar profilácticamente o terapéuticamente. Además, las APC modificadas utilizando polipéptidos carbamoilados son adecuadas para aplicaciones terapéuticas y preventivas. Los procedimientos para obtener y la expansión *ex vivo* de las APC, así como la re-infusión de las APC modificadas *ex vivo* en un organismo se han publicado en muchas ocasiones y están en la experiencia de la técnica.

La invención se explica utilizando los siguientes ejemplos pero no se restringe a estos:

Ejemplo 1: Carbamoilación de polipéptidos mediante el tratamiento con urea a alta temperatura

Se mezclaron proteína p24 de cápside de VIH purificada (0,84 mg/ml; disuelta en 150 mM de NaCl, 50 mM de NaP, pH 7,6), albúmina de suero bovino disponible en el mercado (BSA; fracción V de albúmina, Applichem); (1 mg/ml en H₂O) o partículas VP2 de parvovirus B19 (Lindner y col. (2008), Journal of Infectious Diseases, 198:1677); (0,64 mg/ml disuelto en un 38 % (p/v) de CsCl) 1:1:1 (vol/vol/vol) con H₂O y 30 mM de Tris pH 3,9 o 6 M de una solución de urea recién preparada y 30 mM de Tris pH 3,9 y luego se incubó durante 60 min a 96 °C en un thermoshaker (300 rpm). Después, se separaron las proteínas mediante un 12,5 % (p24 de VIH) o un 10 % SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) (BSA, VP2 de parvovirus B19) y se visualizaron las proteínas mediante la tinción con azul brillante de Coomassie. La separación de proteínas por SDS PAGE y la tinción de proteínas se llevó a cabo como se describe en el manual de laboratorio "Molecular cloning: A laboratory manual, tercera edición (Sambrook y col. (2001), Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

Estos experimentos demostraban que la incubación con urea a alta temperatura da como resultado una modificación química de polipéptidos, como se muestra por un comportamiento de migración alterado en geles de poliacrilamida SDS. En el presente documento, polipéptidos diferentes, por ejemplo p24 de VIH, BSA y VP2 de parvovirus B19 revelaban diferencias impresionantes en el cambio de masa observado, dependiendo del número de la dosis de carbamoilación y la eficacia de la carbamoilación.

Ejemplo 2: Carbamoilación de polipéptidos por diferentes protocolos de carbamoilación

La BSA disponible en el mercado (1 mg/ml en H₂O) se mezcló 1:1:1 (vol/vol/vol) con H₂O/HCl (pH 3,6) y 30 mM de Tris pH 3,6 o con una solución de urea 6 M y 30 mM de Tris pH 3,6 y se incubaron las muestras durante 0 min, 30 min o 60 min a 96 °C en un thermoshaker (300 rpm). De manera alternativa, se trató el BSA a continuación de un protocolo de carbamoilación proteica descrito por Angel y colegas (Angel y col. (2007) Rapid Commun. Mass Spectrom. 21:1623). Se disolvieron 10 nmol de BSA en 100 µl de urea 8 M / 200 mM de Tris-HCl, pH 7,4. Esta solución se redujo con 20 mM de ditioneitol (DTT) durante 2 horas a 50 °C, seguido por carbamidometilación con 45 mM de yodoacetamida (IDA) a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de las proteínas desnaturalizadas, reducidas y alquiladas se diluyeron 1:8 con 50 mM de bicarbonato amónico para ajustar la concentración de urea a 1 M y se incubó durante una noche a 37 °C. Después, la solución se secó y se disolvió en 300 µl de urea 8 M/200 mM de Tris-HCl, pH 8,5. Después se removieron las muestras hasta la solubilización completa y después se incubó durante 4 horas a 80 °C, con removido periódico de las muestras (Angel y col. (2007) Rapid Commun. Mass Spectrom. 21:1623). Después las proteínas carbamoiladas se separaron por electroforesis con un 10 % de SDS-gel de poliacrilamida (PAGE) y se visualizaron por medio de tinción con azul brillante de Coomassie.

Este estudio demuestra que la incubación de BSA con urea siguiendo diferentes protocolos de carbamoilación da como resultado una eficacia variable de la carbamoilación proteica. En el presente documento, la incubación de BSA con urea a 96 °C durante 60 min induce una carbamoilación más eficaz de BSA que el tratamiento con urea durante 30 min como se demuestra por una migración reducida en geles de SDS poliacrilamida. En comparación con el tratamiento con urea depuesta a altas temperaturas, el protocolo de carbamoilación de Angel y colegas inducía una carbamoilación más eficaz de BSA. Los resultados de estos experimentos demuestran que la eficacia de la carbamoilación polipeptídica se puede controlar utilizando diferentes protocolos de carbamoilación, variando de esta manera los productos de inicio y el tiempo de incubación.

Ejemplo 3: Carbamoilación de BSA con urea siguiendo diferentes protocolos de carbamoilación que da como resultado proteínas BSA modificadas que revelan un valor pK_i alterado

La BSA disponible en el mercado (1 mg/ml en H₂O) se mezcló 1:1:1 (vol/vol/vol) con H₂O/HCl (pH 3,6) y 30 mM de Tris pH 3,6 o con una solución de urea 6 M y 30 mM de Tris pH 3,6 y se incubaron las muestras durante 0 min, 30 min o 60 min a 96 °C. De manera alternativa, se trató el BSA a continuación de un protocolo de carbamoilación proteica descrito por Angel y colegas (Angel y col. (2007) Rapid Commun. Mass Spectrom. 21:1623) como se ha descrito en el Ejemplo 2. Después las proteínas de BSA modificadas se separaron por enfoque isoeléctrico sobre tiras IEF a 26350 Vh seguido por electroforesis con un 10 % de SDS-PAGE y se visualizaron por medio de tinción con plata. Se llevó a cabo electroforesis en 2-D como se describe esencialmente en el manual del "ImmobilineR DryStrip Kit for 2-D electrophoresis with ImmobilineR DryStrip and ExcelGel™ SDS" 18-1038-63 Edición AB (Pharmacia Biotech) utilizando el Sistema de Electroforesis Multiphor II (Pharmacia) y el Electroforesis Power Supply EPS 3500 XL.

Estos experimentos demuestran que la modificación química de BSA que resulta de diferentes protocolos de carbamoilación disminuye el punto isoeléctrico de BSA. En el presente documento la reducción del punto isoeléctrico se correlaciona con el grado de carbamoilación. En el presente documento, el tratamiento de proteínas siguiendo el protocolo de Angel y colegas induce el cambio más fuerte de punto isoeléctrico de BSA seguido por el calentamiento de la BSA a 96 °C en urea durante 60 min o calentado la BSA a 96 °C en urea durante 30 minutos. Además, el calentamiento de la BSA en urea a 96 °C durante 60 min daba como resultado la producción de 2 formas de proteínas de BSA carbamoiladas parcialmente.

Ejemplo 4: Influencia del valor del pH sobre la carbamoilación de BSA por el tratamiento con una solución de urea 2 M

En este experimento, se mezcló la albúmina sérica bovina (BSA; 1 mg/ml en H₂O) 1:1:1 (vol/vol/vol) con una solución de urea 6 M y 30 mM de Tris pH 3,9 o 30 mM de Tris pH 6,8 o 30 mM de Tris pH 8,7 o alternativamente se mezcló BSA (1 mg/ml en H₂O) 1:1:1 (vol/vol/vol) con H₂O y 30 mM de Tris pH 3,9 o 30 mM de Tris pH 6,8 o 30 mM de Tris pH 8,7. Después se incubaron las muestras durante 2 horas a 96 °C en un thermoshaker (300 rpm) y se separaron por un 10 % de SDS-PAGE. Las proteínas se visualizaron por tinción con azul brillante de Coomassie.

Estos experimentos demostraban que la modificación química (carbamoilación parcial) de BSA observada después del tratamiento con 2 M de urea, 10 mM de Tris durante 2 h a 96 °C no estaba sustancialmente influenciada por el valor del pH, que varaba desde un pH de 3,9 a un pH de 8,7.

Ejemplo 5. Papel del tiempo de incubación en la carbamoilación de BSA mediada por urea

Se mezcló BSA (1 mg/ml en H₂O 1:1:1 (vol/vol/vol) con urea 6 M y 30 mM de Tris pH 3,9 y se incubó durante a 60 minutos (0, 2, 3, 4, 5, 20, 30, 45, 60 min) a 96 °C. En un experimento independiente la BSA se mezcló 1:1:1 (vol/vol/vol) con urea 6 M y 30 mM de Tris pH 3,9 y se incubó durante 0 a 8 horas (0, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8 horas) a 96 °C. Después, se separan las muestras por un 10 % de SDS-PAGE y se visualizaron las proteínas por tinción por medio de tinción con azul brillante de Coomassie.

Estos experimentos demostraban que el tratamiento de la BSA con urea 6 M y 30 mM de Tris pH 3,9 a 96 °C da como resultado una aumento dependiente del tiempo de la extensión de carbamoilación de BSA, como se muestra por la sedimentación desacelerada de las proteínas BSA modificadas en geles de poliacrilamida SDS. En el presente documento el aumento detectable en el peso molecular de BSA se observaba ya tras 2 a 3 minutos de la incubación. Un aumento de la masa molecular de BSA se observó hasta las 2 horas de incubación. En puntos de tiempo posteriores el tratamiento de BSA con urea a 96 °C daba como resultado cantidades detectables de proteína BSA, sugiriendo fuertemente un aumento de la degradación de la BSA modificada.

Ejemplo 6: Influencia de la temperatura de incubación en la carbamoilación de BSA mediada por urea

Se mezcló BSA (1 mg/ml en H₂O) 1:1:1 (vol/vol/vol) con urea 6 M y 30 mM de Tris pH 3,9 y se incubó durante 2 horas a temperaturas que variaban desde 0 a 96 °C (0, 4, 18, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 96 °C). Después, las muestras se separaron por un 10 % de SDS-PAGE y se visualizaron las proteínas por tinción por medio de tinción de azul brillante de Coomassie.

Con las condiciones de ensayo descritas, se vio una carbamoilación detectable de BSA a temperaturas de incubación mayor de 60 °C.

Ejemplo 7: Modulación del punto isoeléctrico de la proteína IE1 de citomegalovirus (CMV) humano por el tratamiento con urea depuesta (calentada durante más de 1 hora a 96 °C, después se incubó durante 7 a 14 días a temperatura ambiente).

100 µl de proteína IE1 (0,89 µg/ml en solución salina tampón fosfato (PBS) (Lonza)) o IE1 (en PBS) se mezclaron hasta 1:1 (vol/vol) con 8 M de urea depuesta (calentada durante más de 1 hora a 96 °C, después se incubó durante 7 a 15 días a temperatura ambiente) se incubaban durante una noche a 4 °C. Después, las proteínas se separaron por enfoque isoeléctrico en tiras IEF (Immobiline™ DryStrip pH 3-10, 13 cm, GE Healthcare) a 37500 Vh seguido por un 10 % de SDS-PAGE. Se visualizaron las proteínas por tinción con plata.

Los resultados de estos experimentos muestran, que la incubación con urea depuesta induce modificaciones químicas que bajan el punto isoeléctrico de IE1 de CMV.

Ejemplo 8: Análisis de MS MALDI-TOF de BSA sin tratar y carbamoilada

Para la preparación de la diana de la MALDI-TOF se utilizó el procedimiento de la gota seca. Por lo tanto, los polipéptidos se disolvieron en un tampón (50% de acetonitrilo (ACN), LC/NS de calidad (J.T Baker), un 0,01 % de ácido trifluoroacético (TFA), polipéptido de calidad de secuenciación (Applied biosystems) y después se disolvieron directamente con la solución de la matriz que comprendía ácido α -ciano-4-hidroxicinámico con una relación de matriz respecto a la muestra de 1:1 a 10:1. Posteriormente, se aplicó 1 µl de la mezcla matriz-muestra en una placa de muestras, se secó a temperatura ambiente y se analizó utilizando el analizador MALDI TOF 4800 plus de Applied Biosystems. Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF de extracción retrasada reflejo V con reflector Bruker equipado con un digitalizador LeCry de 2 GHz y láser N2 de 337 nm utilizando los siguientes parámetros: polaridad positiva, voltaje de aceleración 20 kV; IS/2 17 kV; voltaje de la lente de enfoque 8,90 kV; retraso de extracción 400 ns. El detector estaba regulado. Normalmente, se acumularon 100 disparos desde tres a cinco posiciones diferentes en un punto de muestra- Las identificaciones de las proteínas se obtuvieron utilizando MASCOT (MatrixScience) y explorando huellas de masa peptídica coincidentes en una base de datos proteica. Los criterios de búsqueda que se utilizaron fueron modificación fija de carboxamidometilación de cisteína, modificación variable de oxidación de metionina y precisión considerada de pl experimental respecto a

teórica y peso molecular. Las valoraciones de la proteína eran significativas cuando el valor de p era menor de 0,05 (valor de p es la probabilidad de que la coincidencia observada sea un evento aleatorio).

5 Los espectros se obtuvieron a partir de BSA no modificada; masa doble isotópica protonada 33230,3 y BSA después de la mezcla (1:1; vol/vol) con urea depuesta 8 M (calentada durante más de 1 hora a 96 °C, después se incubó durante 7 a 14 días a temperatura ambiente); masa doble isotópica protonada 33497. Por lo tanto, en estas condiciones de reacción el tratamiento con urea de BSA inducía un cambio de masa de 226,7 Dalton que se corresponde con $12,4 \pm 2$ carbamoilaciones.

Ejemplo 9: Análisis de carbamoilación de polipéptidos espectroscopio de resonancia magnética nuclear (NMR)

10 Con la proteína sin marcar el procedimiento habitual es registrar un grupo de dos experimentos de NMR homonuclear 2D: COSY, TOCSY y NOESY. Por lo tanto, 190 µl de solución polipeptídicas, 190 µl de PBS (Lonza) y 20 µl de solución de referencia S5 (D₂O más ácido trimetilsilil-2,2,3,3-tetradeuteropropiónico (TSP) se dieron en un tubo NMR de 5 mm (Norell 502). Las muestras se mezclaron homogéneamente invirtiendo con cuidado el tubo cerrado y se analiza en un espectrómetro Bruker AVANCE II+ 600 MHz NMR con los siguientes parámetros:

15 Temperatura: 283 °K (10 °C)
Cabeza de muestra: TXI
Procedimiento: 500-XXX-Lif600-TXI-V1
NS (transitorios): 128 (Espectros 1D) bzw. 15 (Espectros 2D)
SWH (ventana del espectro): 9591 Hz (equivalente a 16 ppm)
D1 (tiempo entre transitorios): 2 s

20 **Ejemplo 10:** Papel de la temperatura de incubación y el tiempo de incubación en la carbamoilación de BSA inducida por urea

25 En este experimento se mezcló BSA (1 mg/ml en H₂O) 1:1 (vol/vol) con una solución de urea 4 M recién preparada, o 4 M de urea que se pre-trató durante 1 hora a 96 °C, y después se enfrió rápidamente a 40 °C y se mantuvo durante 20 min a 40 °C. Después las muestras se incubaron durante 0, 2, 4 o 17 horas a 40 °C en una thermoshaker (300 rpm). Después, las proteínas se separaron por un 10 % de SDS-PAGE y se visualizaron las proteínas por tinción con azul brillante de Coomassie.

30 Estos experimentos demuestran que la solución de urea 4 M recién preparada era menos eficaz que la urea calentada en la carbamoilación de BSA. Además, era detectable un aumento significativo en el peso molecular de BSA después de 17 horas, pero no después de 2 y 4 horas de incubación con urea recién preparada y precalentada. En las condiciones descritas la BSA tratada con urea revelaba solo un débil aumento en su peso molecular indicando una carbamoilación parcial de BSA.

Ejemplo 11: Carbamoilación de BSA por urea depuesta

35 Se mezcló BSA (1 mg/ml en H₂O) 1:1 (vol/vol) con urea 4 M depositada (que se había pre-tratado durante 1 hora a 96 °C y después incubado durante 8 días a temperatura ambiente) y después se incubó durante 0 a 24 horas (0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 horas) a 40 °C. Después las muestras se separaron por un 10 % de SDS-PAGE y se visualizaron las proteínas por tinción con azul brillante de Coomassie.

En estos experimentos, se observó un aumento detectable del peso molecular de BSA a las 24 horas, pero no a las 2 a 10 horas de la incubación con urea depuesta.

40 **Ejemplo 12:** La modificación química (carbamoilación) de BSA con urea depuesta da como resultado proteínas de BSA modificadas que revelan un valor de pK_i alterado

45 Se mezcló BSA (1 mg/ml en H₂O) 1:1:1 (vol/vol/vol) con H₂O/HCl (pH 3,6) y 30 mM de Tris pH 3,6 o con una solución 6 M de urea y 30 mM de Tris pH 3,6 y se incubaron las muestras durante 0 min, 30 min, o 60 min a 96 °C. De manera alternativa se mezclaron 10 mM de BSA 1:1 (vol/vol) con 4 M de urea depuesta (calentada 1 hora a 96 °C, después mantenida durante 3 meses a temperatura ambiente) y se incubó durante 20 horas a 40 °C. Después, se separaron las proteínas por enfoque isoelectrico sobre tiras IEF (Immobiline™ DryStrip pH 3-10, 11 cm, GE Healthcare) a 26350 Vh seguido por un 10 % de SDS-PAGE y se visualizaron las proteínas por tinción con plata.

50 Estos experimentos demuestran que tanto el calentamiento de las mezclas de urea/BSA como la incubación de BSA con urea depuesta daban como resultado una proteína BSA modificada que revelaba un punto isoelectrico alterado. En las condiciones descritas el calentamiento de las mezclas de BSA/urea a 96 °C daba como resultado una reducción más fuerte del punto isoelectrico en comparación con la incubación de BSA con urea depuesta a 40 °C. Además, el calentamiento de las mezclas de BSA/urea alargado daba como resultado una disminución continua del punto isoelectrico de BSA, indicando un aumento de la carbamoilación de BSA.

Ejemplo 14: Carbamoilación química de BSA por tratamiento con cianato potásico

En estos experimentos, se incubó BSA (1 mg/ml en H₂O) se incubó durante 1 hora a 40 °C con 25, 100, 500 o 1000 mM de cianato potásico, en un thermoshaker (300 rpm). Después, se separaron las muestras por un 12,5 de SDS-PAGE y se visualizaron por medio de tinción con azul brillante de Coomassie. En estas investigaciones, la incubación con cianato potásico inducía un aumento significativo del peso molecular de BSA por carbamoilación.

Ejemplo 15: Producción y purificación de la proteína IE1 de citomegalovirus (CMV) humano en *E. coli*

En estos experimentos, se incubó BSA (1 mg/ml en H₂O) durante 19,5 horas a 40 °C con 0 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 100 mM, 200 mM o 500 mM de cianato potásico en un thermoshaker (300 rpm). Después, se separaron las muestras por un 10 % de SDS PAGE y se visualizó por medio de tinción con azul brillante de Coomassie. En estas investigaciones, la incubación con cianato potásico inducía un aumento significativo de la masa molecular de BSA por carbamoilación.

Ejemplo 16: Producción y purificación de la proteína IE1 de citomegalovirus (CMV) en *E. coli*

Con el fin de producir proteína IE1 de citomegalovirus (CMV) humano, se transformó el plásmido pGEX-KG-IE1 en la cepa M15[pRep4]. Para la construcción del of pGEX-KG-IE1, el gen que codifica la proteína IE1 se escindió del plásmido pcDNA-IE1, utilizando las enzimas de restricción HindIII/EcoRI y se trataron con enzima Klenow. El fragmento obtenido se clonó entonces en el plásmido pGEX-KG digerido con SmaI/EcoRI, que se trató con fosfatasa alcalina, antes de la unión para evitar la autohibridación del vector. Para la generación del pcDNA-IE1 la región codificante de la proteína IE1 se escindió con KpnI/BamHI a partir del plásmido pCGN-IE1 (Nevels y col. (2004), J. Virol. 78:7803) y se insertó en el plásmido pcDNA3 (Invitrogen) escindido con KpnI/BamHI. Todas las etapas de clonación se llevaron a cabo esencialmente como se describe en el manual de laboratorio "Molecular cloning: A laboratory manual, tercera edición (Sambrook y col. (2001), Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

El plásmido pRep4 codifica un represor del promotor lac (IacI^q) y de esa manera permite casi la represión completa de la producción proteica por los vectores de expresión pGEX en ausencia del inductor de expresión proteica. Para la producción de IE1 de CMV, se diluyeron cultivos de una noche de la cepa M15[pRep4] de *E. coli* transformadas con pGEX-KG-IE1 en un medio LB_{amp/kana} y se indujo la expresión de IE1 durante 16 horas con 1 mM de isopropil tiogalactósido (IPTG). Las células inducidas producían niveles aumentados de proteínas IE1 con peso moleculares de aproximadamente 80 y 32 kDa, que se corresponde a la glutatión S transferasa (GST)-IE1 y proteínas GST y proteínas adicionales con un peso molecular más bajo, que representaban productos de gradación de la GST-IE1 y proteína GST. La identidad de estas proteínas se confirmó por inmunotransferencia utilizando un anticuerpo monoclonal anti-IE1 de ratón específico de IE1 (clon 1B12) (Zhu y col. 1995, J. Virol. 69: 7960). Por lo tanto, las células M15[pRep4] se transfectaron con el plásmido pGEX-KG-IE1 y se lisaron alícuotas de células antes y después de la inducción de 1 hora con IPTG. Después, los lisados celulares se sometieron a un 10 % de SDS-PAGE y las proteínas separadas se transfirieron a nitrocelulosa. Después, las proteínas IE1 se visualizaron utilizando un anticuerpo monoclonal anti-IE1 (clon 1B12). La separación de las proteínas por SDS PAGE y análisis posterior de proteínas por inmunotransferencia se llevó a cabo como se describe en el manual de laboratorio "Molecular cloning: A laboratory manual, tercera edición (Sambrook y col. (2001), Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

Para la purificación de las proteínas IE1 se sedimentaron las células M15[pRep4] transformadas con pGEX-KG-IE1 después de 16 horas de la inducción con IPTG por centrifugación durante 10 min a 11000 rpm en una centrífuga 5417R Eppendorf y el aglomerado se re-suspendió en PBS (Lonza) sin iones bivalentes (140 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄). Además se añadió un coctel inhibidor de proteasas (completo, Roche, 1 comprimido en 50 ml de PBS (Lonza)) para evitar la degradación proteica. Después las células se lisaron completamente utilizan una prensa de French (1,5 kbares, 4 °C) y los residuos celulares se sedimentaron por centrifugación (15000 rpm, 30 min, 4 °C en un rotor SS34 Sorvall). La fracción soluble del lisado celular incluyendo la proteína de fusión GST-IE1 se purificó entonces utilizando una columna GST. En el presente documento, el enriquecimiento de la proteína de fusión GST-IE1 se consiguió uniendo la a Glutatión Sepharose™ y posteriormente por elución con glutatión reducido (50 mM Tris/HCl, 10 mM de glutatión reducido, pH 8,5). El eluido se recolectó en fracciones de 2 ml y se determinó el contenido de proteína de cada fracción midiendo la densidad óptica a 280 nm. Las fracciones que contenían proteínas se analizaron por un 12,5 % de SDS-PAGE y se visualizó mediante tinción con azul brillante de Coomassie. Las fracciones que contenían la proteína de fusión GST-IE1 se combinaron e incubaron durante tres horas con trombina (7 U/mg proteína de fusión GST-IE1) para separar el marcador GST. Después, se separó la IE1 de las proteínas de fusión GST-IE1 por cromatografía de intercambio aniónico utilizando columnas HQ-Poros® (Applied Biosystems). En el presente documento, GST e IE1 presentan diferencias sorprendentes en sus punto isoeléctricos (GST: 6,52; IE1: 4,58). Mientras que la GST no se une a la columna y se puede detectar en el flujo directo, IE1 se une y se puede eluir de la columna con 540 mM de NaCl utilizando un gradiente de NaCl lineal (50 mM a 1 M). El eluido se recolectó en fracciones de 2 ml y el contenido proteico de cada fracción se determinó midiendo la densidad óptica a 280 nm. Las fracciones que contenían proteína se analizaron por un 12,5 % de SDS-PAGE y se tiñeron con azul brillante de Coomassie. Las fracciones que contenían proteína IE1 se combinaron. Para la separación de las proteínas de fusión GST-IE1 residuales se sometieron los antígenos combinados a una segunda separación en una columna GST. En el presente documento, GST-IE1 se une a la

matriz Glutación Sepharose™, mientras que IE1 no se une y se puede detectar en el flujo continuo. Con el fin de analizar la pureza e identidad, la IE1 obtenido se sometió a un 12,5 SDS-PAGE y se analizó el gel por tinción con azul brillante de Coomassie. Además, las proteínas se transfirieron desde geles separados a nitrocelulosa y las proteínas IE1 se visualizaron específicamente por inmunotransferencia utilizando un anticuerpo monoclonal específico de IE1 (clon 1B12).

La proteína IE1 obtenida revelaba una pureza de > 90 %. La proteína se concentró utilizando dispositivos de concentración Amicon y filtros con un corte de 25 kDa. La concentración de IE1 purificada se determinó por determinación del coeficiente de extinción molar. En el presente documento, un valor de DO₂₈₀ de 21500 se relaciona con 1 mol de la proteína IE1. 4 a 8 mg de IE1 purificada se obtuvieron de 1 l de caldo de cultivo.

Ejemplo 16: Capacidad de proteína IE1 carbamoilada y péptido YIL para reactivar específicamente linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺

Aquí se analizó la idoneidad de la proteína IE1 carbamoilada y el péptido YIL para sr presentados sobre moléculas del MHC de las clases I y II y posteriormente la capacidad para reactivar los linfocitos T CD4⁺ y CD98⁺ específicos de polipéptidos mediante citometría de flujo. Esto se basa en la observación de que casi todos los donantes de sangre positivos a CMV, positivos a HLA A2 poseen linfocitos T CD8⁺ citotóxicos que reconocen un epítipo específico (YILEETSVML (SEQ ID NO: 4); aminoácidos 315-324), (Prod'homme y col. (2003), J. Immunol. 170:2030) de la proteína IE1 de CMV.

Para el control, las muestras se estimularon con el péptido E10F, cubriendo una epítipo murino de CTL en la región p24 de la cápside de VIH-1(BH10) Gag (aa 291-300) (Wild y col., (2004) Vaccine. 2004; 22:1732-1743).

Por lo tanto se incubó sangre entera heparinizada de un donante seropositivo en alícuotas de 1 ml en tubos Falcon (BD) estériles con proteína IE-1 no modificada y carbamoilada y péptido YIL. Para la carbamoilación se mezclaron la proteína IE1 purificada (0,89 µg/ml en PBS (Lonza)) o péptido YIL purificado 1:1 (vol/vol) con 8 M de urea depuesta (pre-incubada durante una noche a 96 °C) y se incubó durante una noche a 40 °C. Se llevaron a cabo las siguientes estimulaciones:

- 1: péptido de control: péptido derivado de Pr55^{gag} de VIH no modificado (10 µg/ml)
- 2: proteína IE1 no modificada (10 µg/ml)
- 3: proteína IE1 carbamoilada (10 µg/ml)
- 4: péptido YIL derivado de IE1 no modificado (10 µg/ml)
- 5: péptido YIL derivado de IE1 carbamoilado (10 µg/ml)

Además de las proteína o péptidos se añadieron anticuerpos monoclonales contra moléculas co-estimulantes CD28 y CD49d (Becton Dickinson) a una concentración final de 1 µg/ml. Las células se incubaron entonces a 37 °C durante 2 horas. Después, se añadieron 10 µg/ml de Brefeldin A a las muestras para evitar la secreción de citocina. Las muestras se removieron completamente y se incubaron a 37 °C durante 7 horas adicionales.

Tas 9 horas de incubación se añadieron 100 µl de solución EDTA enfriada en hielo (EDTA en PBS (Lonza), 20 mM). Las muestras se removieron brevemente y después se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se removieron completamente y se incubaron con 9 ml de solución de lisado FACS (BD) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron entonces a 4 °C durante 8 minutos a 340 g. El sobrenadante se decantó cuidadosamente y se lavaron las células dos veces con 9 ml de tampón FACS (PBS (Lonza) + un 0,1 % p/v NaN₃ + un 1 % p/v de FCS) Las células se re-suspendieron entonces en un pequeño volumen de tampón FACS para la tinción de las moléculas de superficie. A continuación se añadieron anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo contra las moléculas de superficie (CD3 FITC, CD4 ECD y CD8 APC) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min en oscuridad. Las células se lavaron entonces con tampón FACS como se ha descrito anteriormente, se fijaron mediante la adición de 0,5 ml de paraformaldehído al 2 % (" % en PBS (Lonza)) y se incubaron durante 10 min en oscuridad. Las células se transfirieron entonces a tubos FACS (BD) y se lavaron con 3 ml de tampón FACS. A continuación se llevó a cabo la permeabilización y tinción intracelular. A continuación, se pipetearon en las células 10 µl de solución permeabilizante (un 2 % de Saponina en PBS) y un anticuerpo monoclonal IFN-γ-PE conjugado con fluorocromo (de acuerdo con el protocolo del fabricante). Las muestras se removieron completamente y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Las células se lavaron entonces dos veces con 3 ml de una solución de Saponina al 0,1 % (un 0,1 % de Saponina en PBS (Lonza)) y se fijaron en 0,5 ml de para formaldehído (al 1 % en PBS (Lonza)). Las células teñidas eran en nm en un citómetro de flujo FAGS Epics XL MCL (Beckman Coulter) y los resultados se evaluaron utilizando un Software CellQuest (Becton Dickinson).

Los resultados muestran que se pueden recuperar significativamente más células que expresan CD3 y CD8 por estimulación con polipéptidos carbamoilados.

Ejemplo 17: Capacidad de péptidos carbamoilados con cianato y urea para reactivar específicamente linfocitos T CD8⁺

La capacidad de los péptidos carbamoilados para reactivar los linfocitos T CD8⁺ se analizó utilizando análisis citométricos de flujo la producción intracelular de IFN-γ después de la incubación específica del péptido. A

continuación se incubó sangre completa con diferentes formulaciones del péptido YIL durante 9 horas y se tiñeron las PBMC de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente en el **Ejemplo 16**. En estos experimentos el péptido YIL (10 µg/µl en 100 % de DMSO) se mezcló 1:1 (vol/vol) o con 8 M de urea depuesta (pre-incubada durante una noche a 96 °C) o 200 mM de KOCN y se incubó durante una noche a 40 °C. Se llevaron a cabo las siguientes estimulaciones:

- 1: 10 µg/ml de péptido de control, péptido E10F de la p24 de VIH
- 2: 10 µg/ml de péptido YIL derivado de la IE1 de CMV
- 3: 10 µg/ml de péptido YIL carbamoilado derivado de la IE1 de CMV con 100 mM de KOCN (incluyendo una concentración final de 200 µM de KOCN en la muestra de sangre estimulada)
- 4: 10 µg/ml de péptido YIL carbamoilado derivado de la IE1 de CMV con 4 M de urea (incluyendo una concentración final de 8 mM de urea en la muestra de sangre estimulada)
- 5: 200 µM de KOCN (concentración final en la muestra de sangre estimulada)
- 6: 8 mM de urea (concentración final en la muestra de sangre estimulada)

Los resultados muestran que con 200 mM del péptido YIL carbamoilado con KOCN reactiva significativamente más linfocitos T CD8⁺ que el péptido YIL no carbamoilado.

Ejemplo 18: Capacidad de los péptidos y proteínas carbamoilados con cianato para reactivar linfocitos T CD8⁺

En este experimento se analizó la capacidad del péptido YIL de CMV carbamoilado con cianato y proteína pp65 para reactivar específicamente linfocitos T CD8⁺. Por lo tanto se incubó sangre completa con diferentes formulaciones del péptido YIL durante 6 horas y se tiñeron las PBMC de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente en el **Ejemplo 16**. En estos experimentos el péptido YIL (2 µg/µl en un 100 % de DMSO) se mezcló 1:1 (vol/vol) con 200 mM, 400 mM, o 1000 mM de KOCN en H₂O y se incubó durante una noche a 40 °C. La región inmunodominante de CMV (cepa AD169) pp65 (aa 862-1048; RecMol UL83-Pp65, Cat. No 1B023A) se disolvió en H₂O incluyendo 140 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 1,8 mM de KH₂PO₄ así como diferentes concentraciones de KOCN que varían de 0 a 500 mM y se incubó durante una noche a 40 °C. Se llevaron a cabo las siguientes estimulaciones:

- 1: células no estimuladas (control negativo)
- 2: 10 µg/ml de péptido YIL de la IE1 de CMV
- 3: 10 µg/ml de péptido YIL carbamoilado de la IE1 de CMV con 100 mM de KOCN (incluyendo una concentración final de 1 mM de KOCN en la muestra de sangre estimulada)
- 4: 10 µg/ml de péptido YIL carbamoilado de la IE1 de CMV con 200 mM de KOCN (incluyendo una concentración final de 2 mM de KOCN en la muestra de sangre estimulada)
- 5: 10 µg/ml de péptido YIL carbamoilado de la IE1 de CMV con 500 mM de KOCN (incluyendo una concentración final de 5 mM de KOCN en la muestra de sangre estimulada)
- 6: 10 µg/ml de proteína pp65 de CMV (región inmunodominante)
- 7: 10 µg/ml de proteína pp65 carbamoilada del CMV con 100 mM de KOCN (incluyendo una concentración final de 1 mM de KOCN en la muestra de sangre estimulada)
- 8: 10 µg/ml de proteína pp65 carbamoilada del CMV con 200 mM de KOCN (incluyendo una concentración final de 2 mM de KOCN en la muestra de sangre estimulada)
- 9: 10 µg/ml de proteína pp65 carbamoilada del CMV con 500 mM de KOCN (incluyendo una concentración final de 5 mM de KOCN en la muestra de sangre estimulada)

Los resultados muestran que el péptido YIL carbamoilado con cianato potásico y la proteína pp65 en presencia de 0,04 M de urea revelan un aumento de la capacidad para reactivar específicamente linfocitos T CD8⁺ respecto al péptido YIL y proteína pp65 no carbamoilados, respectivamente. En este caso, el tratamiento de pp65 con concentraciones crecientes de cianato potásico que varían desde 100 a 500 mM se correlaciona directamente con un aumento de la capacidad de pp65 para activar específicamente linfocitos T CD8⁺ para la producción de IFN-γ. Por el contrario – para el péptido YIL- el pre-tratamiento con 100 mM y 200 mM de cianato potásico es más eficaz para aumentar la potencia de YIL para estimular específicamente linfocitos T CD8⁺ que el per-tratamiento de YIL con 500 mM de cianato potásico.

Ejemplo 19: La capacidad de antígeno p24 de la cápside del VIH modificado por urea en combinación con el ODN CpG 1668 para activar los linfocitos T CD8⁺ específicos de p24 de VIH en ratones.

La capacidad de la proteína p24 carbamoilada de la cápside del VIH para estimular linfocitos T CD8⁺ específicos de p24 se analizó en un modelo de ratón BALB/c. Por lo tanto, se trató una alícuota de p 24 recombinante purificada durante una noche a 40 °C con urea depuesta (pre-calentada durante 1 hora a 96 °C) y después se dializó extensamente contra 0,04 M de urea en PBS (Lonza). Seis ratones BALB/c hembras de una edad de 40 a 60 días de edad se inmunizaron por vía intramuscular con 10 µg de p24 sin modificar en ausencia (grupo 4) o presencia de 50 µg/dosis de ODN CpG 1668 (grupo 5) o p24 modificada tratada con urea (up24) en ausencia (grupo 2) o presencia de 50 µg/dosis de ODN CpG 1668 (grupo 3). Los inmunógenos se administraron en un volumen total de 100 µg en PBS (Lonza). Para los controles, se inmunizaron grupos de seis ratones con 0,04 M de una solución de urea (grupo 1) o 10 µg de partículas tipo virus (VLP) Gag de HIV derivadas de HIV de células de insecto (Deml y col.

2005, Mol. Immunol. 42:259) en un volumen total de 100 µl en PBS (Lonza). Todos los animales se inmunizaron la semana 0 y recibieron una inyección de refuerzo con los mismos inmunógenos las semanas 2 y 4. A las semanas 3 y 6, tres ratones de cada grupo se sacrificaron por dislocación cervical y se retiraron los bazos de manera aséptica.

5 A continuación se colocaron los bazos en tubos Falcon de 50 ml (BD Heidelberg, Alemania) que contenían 10 ml de medio de esplenocitos (medio RPMI; un 5 % de suero fetal bovino (FCS) inactivado por calor, 20 mM de HEPES, 50 µM de 2-mercapto-etanol, un 1 % de solución de Pen/Estrep) y se mantuvieron a temperatura ambiente (no más de 15 minutos). Se substituyó el medio por el mismo volumen de medio de esplenocitos reciente y los bazos se transfirieron a un tamiz celular de 70 µM (Nº de cat. BD 352350), que se colocó en un tubo Falcon de 5 ml. Las suspensiones de célula única se generaron moliendo el bazo contra el tamiz celular con el émbolo de una jeringa de 10 hasta que la mayoría del tejido fibroso se retiraba. Las células singularizadas se aspiraron del tamiz celular añadiendo repetidamente 2 ml de medio de esplenocitos. Las suspensiones celulares obtenidas se sedimentaron por centrifugación a 300 g durante 5 min a temperatura ambiente y las células aglomeradas se re-suspendieron en 5 ml de tampón de hemólisis ACK/bazo (150 mM NH₄Cl, 1 mM de KHCO₃, 0,1 mM de Na₂EDTA (Titriplex III); se ajustó el pH a 7,2 a 7,4 con HCl 1 N) por pipeteado suave pero completo con una pipeta plástica de 10 ml o 25 ml. Después, la suspensión celular se centrifugó a 300 g durante 5 min a temperatura ambiente y se lavó tres veces con 10 ml de medio de esplenocitos/bazo. En cada etapa de lavado la suspensión celular se separó del tejido fibroso agregado. Finalmente, las células se re-suspendieron en 5 ml de medio de esplenocitos/bazo, se contaron y se ajustaron a una concentración final de 2 x 10⁶ células/ml en medio de esplenocitos y se conservó a 37 °C (no más de 30 min) hasta su uso.

20 Se cultivaron 2 x 10⁶ esplenocitos murinos en 100 µl de medio de esplenocitos por pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano a 37 °C. Se estimularon las células con 10 µg de péptido p24 tipo C de VIH (AMQILKDTI (SEQ ID NO: 1); aa 197-205 en el caso de ratones inmunizados con p24) o el péptido A9I de VIH_{LAI} (AMQMLKETI (SEQ ID NO: 2); aa 197-205 (Wild y col. (2004), Vaccine 22:1732) en el caso de ratones estimulados con VLP) o para el control negativo con un péptido irrelevante que representa un epítipo de CTL restringido a HLA A2 en el antígeno específico de próstata humano (PSA 141-150 FLTPKKLQCV (SEQ ID NO: 3); Chakraborty y col. (2003), Cancer Immunol. Immunother. 52:497). Una combinación de PMA (12-miristato 13-acetato de forbol) y Ionomicina servían como control positivo. Cada estimulación con polipéptidos se llevó a cabo por duplicado.

Los inmunógenos estimulantes se mezclaron de la siguiente manera:

30 control negativo: 1,5 ml de medio de esplenocitos + 3 µl de Brefeldin A (5 µg/µl) + 3 µl de péptido PSA (10 µg/µl)
 control positivo: 1 ml de medio de esplenocitos + 2 µl de Brefeldin A (5 µg/µl) + 1 µl de PMA (1 µg/µl) + 1 Ionomicina (1 µg/µl)
 solución de péptido p24 tipo C de VIH: 1,5 ml de medio de esplenocitos + 3 µl de Brefeldin A (5 µg/µl) + 3 µl de péptido (10 µg/µl)
 35 solución de péptido A9I de VIH_{LAI}: 0,5 ml de medio de esplenocitos + 1 µl de Brefeldin A (5 µg/µl) + péptido (10 µg/µl)

Las placas se incubaron entonces en una incubadora convencional a 37 °C. Después de 6 horas las muestras se transfirieron en tubos FACS que contenían 1 ml de tampón FACS (PBS (Lonza), un 1 % (v/v) de FCS, un 0,1 % p/v Na₃N). Las muestras se centrifugaron entonces a 4 °C durante 5 minutos a 300 g. El sobrenadante se decantó entonces cuidadosamente y las células se lavaron de nuevo con 1 ml de tampón FACS y se centrifugó de nuevo a 300 g durante 8 minutos. Las células se re-suspendieron en un pequeño volumen (aproximadamente 100 µl) de tampón FACS y se incubaron primero durante 10 min a 4 °C con mAb anti-FcR1/III (PharMingen, Hamburgo, Alemania) para bloquear la unión no específica de anticuerpos conjugados con fluorescencia. Después, se tiñeron marcadores de superficie durante 30 minutos sobre hielo en un volumen de tinción de 100 µl utilizando los siguientes anticuerpos de acuerdo con el protocolo del fabricante: CD3 FITC, CD4 PerCP y CD8 APC. Las células se lavaron entonces con 5 ml de tampón FACS y se centrifugaron durante 5 min a 300 g. Después de eso se fijaron las células con 250 µl de Cytotfix/Cytoperm (un 4 % (p/v) PFA + un 1 % (p/v) de saponina) durante 20 minutos en hielo. Las células se lavaron entonces dos veces con 5 ml de perm/lavado (un 0,1 % (p/v) de saponina en PBS (Lonza)) y se centrifugó durante 5 minutos a 500 g a 4 °C después de cada etapa de lavado. Las células se re-suspendieron en 100 µl de perm/lavado y se tiñó el IFN-γ intracelular utilizando el anticuerpo IFN-γ-PE de acuerdo con el protocolo del fabricante durante 20 minutos en hielo en oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con 5 ml de tampón FACS y se centrifugó durante 5 minutos a 300 g después de cada etapa de lavado. Finalmente, las células se re-suspendieron en 200 µl de un 1 % de una solución de paraformaldehído (PFA). Se llevó a cabo el análisis FACS en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, Alemania), adquiriendo 30.000 linfocitos T CD8⁺ por muestra. Los datos del FACS se analizaron entonces utilizando el software CellQuest.

55 Los resultados demuestran claramente que la inmunización de ratones con p24 carbamoilada en combinación con ODN CpG 1668 induce significativamente más linfocitos T CD8⁺ en comparación con ratones inmunizados con p24 no modificada en ausencia y presencia de ODN CpG 1668 o p24 carbamoilada en ausencia de ODN CpG 1668.

Ejemplo 30: Captación de proteína p24 de la cápside de VIH en células dendríticas maduras

Para determinar si la proteína p24 de la cápside de VIH tiene una propiedad intrínseca para entrar en el citosol de células dendríticas maduras y por tanto se tiene que clasificar dentro del primer o segundo grupo de polipéptidos que se ha definido anteriormente, se llevó a cabo el siguiente ensayo:

5 Se incubaron $6-9 \times 10^5$ células dendríticas maduras/ml en R10 (RPMI 1640, un 10 % de suero AB humano) con 10 $\mu\text{g/ml}$ de proteína p24 recombinante de la cápside de VIH durante 15 min a 37 °C. Posteriormente, se colocaron 333 μl de la suspensión celular en un portaobjetos cytospin (Hettich, Tuttlingen) y el portaobjetos se centrifugó durante 3 min a 300 g. Después de secar los portaobjetos durante 60 min, se cubrieron las células con paraformaldehído (al 4 % en PBS) para la fijación y se incubó durante 15 min a 37 °C. las células se lavaron
10 entonces tres veces con 10 ml de PBS. El área en el que se fijaron las células estaba circunscrita por vaselina. Después se tiñó la membrana citoplasmática de las células con 150 μl (5 $\mu\text{g/ml}$) de un colorante Alexa Flúor (Invitrogen, EE.UU.) durante 10 minutos. Después de lavar los portaobjetos dos veces con 10 ml de PBS, se cubrieron las células con acetona fría a 4 °C con el fin de permeabilizar las células. Las células se saturaron
15 entonces con 150 μl de R10 durante 30 min. Después de retirar el R10, se les administró a las células el anticuerpo fluorescente KC57-FITC para la detección de p24 (Coulter Clone, USA) durante 2 horas de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los portaobjetos se lavaron entonces tres veces con 10 ml de PBS. A continuación, se marcaron los núcleos celulares con 150 μl (10 ng/ml) de 4',6- diamino-2-fenilindol (DAPI) (Roche, Mannheim). El cubreobjetos se lavó entonces con 10 ml de PBS y se secó durante 60 min. Se administraron 15 μl de medio de montaje MobiGlow (MoBiTec, Göttingen) sobre el portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos.
20

Se llevó a cabo entonces la microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio LEICA-DMRX (Leica, Wetzlar). Los resultados se interpretaron utilizando el software Image-Pro Plus 6.2 (MediaCybernetics, USA). Las fotos microscópicas indicaban que la proteína p24 de la cápside de VIH no entra en el citosol de las células dendríticas. Por lo tanto la proteína p24 de la cápside de VIH es un polipéptido de acuerdo con el segundo grupo de polipéptidos que se ha descrito anteriormente.
25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Lophius Biosciences GmbH

30 <120> MÉTODO PARA TRANSFERENCIA DE POLIPÉPTIDOS DENTRO DE CÉLULAS

<130> LOP-002 PCT

<140> desconocido

35 <141> 09-04-2010

<150> EP 09 157 777.5

<151> 09-04-2009

40 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

45 <211> 9

<212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humana

<400> 1

50

Ala Met Gln Ile Leu Lys Asp Thr Ile

1 5

<210> 2

<211> 9

55 <212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humana

<400> 2

ES 2 653 561 T3

Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile
1 5

5
<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Humano

<400>3

Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val
1 5 10

10

15
<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Citomegalovirus

<400> 4

Tyr Ile Leu Glu Glu Thr Ser Val Met Leu
1 5 10

20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de transferencia de polipéptidos en células presentadoras de antígeno (APC), que comprende las siguientes etapas:
 - 5 a) Incubar polipéptidos en una solución que comprende iones cianato, en el que los iones cianato están presentes en una concentración en el intervalo desde aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mmol/l, a temperaturas en el intervalo desde aproximadamente temperatura ambiente a aproximadamente 96 °C y un tiempo de incubación de aproximadamente varios minutos hasta varios días, e
 - b) incubar células presentadoras de antígeno (APC) con los polipéptidos de la etapa (a) en presencia de urea.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas células presentadoras de antígeno (APC) son preferentemente células dendríticas (preferentemente células de Langerhans), monocitos, macrófagos, linfocitos B o células epiteliales vasculares y células epiteliales, mesenquimáticas y células de la microglía del cerebro.
3. Un procedimiento de detección de células inmunitarias específicas de polipéptidos, que comprende las siguientes etapas:
 - 15 a) Incubar polipéptidos en una solución que comprende iones cianato, en el que los iones cianato están presentes en una concentración en el intervalo desde aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mmol/l, a temperaturas en el intervalo desde aproximadamente temperatura ambiente a aproximadamente 96 °C y un tiempo de incubación de aproximadamente varios minutos hasta varios días, e
 - b) incubar cultivos celulares que contienen APC o fluidos corporales que contienen APC con los polipéptidos de la etapa (a) en presencia de urea,
 - 20 c) incubar los cultivos celulares que contienen APC o los fluidos corporales que contienen APC obtenidos de acuerdo con la etapa b) con células inmunitarias o fluidos corporales que contienen células inmunitarias,
 - d) detectar y/o cuantificar simultánea y/o específicamente distintos subtipos de células inmunitarias que sean específicas contra los polipéptidos de la etapa a).
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende las siguientes etapas:
 - 25 a) Incubar polipéptidos en una solución que comprende iones cianato, en el que los iones cianato están presentes en una concentración en el intervalo desde aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mmol/l, a temperaturas en el intervalo desde aproximadamente temperatura ambiente a aproximadamente 96 °C y un tiempo de incubación de aproximadamente varios minutos hasta varios días, e
 - 30 b) incubar cultivos celulares que contienen APC o fluidos corporales que contienen APC con los polipéptidos de la etapa (a) en presencia de urea y con células inmunitarias o fluidos corporales que contienen células inmunitarias,
 - c) detectar y/o cuantificar simultánea y/o específicamente distintos subtipos de células inmunitarias que sean específicas contra los polipéptidos de la etapa a).
- 35 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el cultivo celular que contiene APC es una población de PBMC, células monocíticas aisladas o una población de APC distinta, que comprende preferentemente células dendríticas (preferentemente células de Langerhans), monocitos, macrófagos o linfocitos B, y el fluido corporal que contiene APC es sangre completa o líquido cefalorraquídeo, y/o en el que las células inmunitarias específicas de polipéptidos son linfocitos T, preferentemente linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, linfocitos T CD4⁺CD8^{dim} o linfocitos T reguladores CD4⁺, u otras poblaciones celulares inmunológicas, preferentemente
 - 40 CD56⁺CD8⁺, linfocitos T NK CD56⁺CD57⁺CD8⁺ o células NK CD56⁺, o una mezcla de las mismas y/o en el que los fluidos corporales que contienen células inmunitarias son sangre completa y/o líquido cefalorraquídeo.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3 o 5, en el que la detección y/o la cuantificación se lleva a cabo por medio de una detección de marcadores de superficie específicos para las células inmunitarias específicas de polipéptidos y la producción de las citocinas marcadoras TNF, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17 o TNF- β .
- 45 7. Un procedimiento para la estimulación, expansión y/o reactivación de linfocitos T específicos de polipéptidos que comprende las siguientes etapas:
 - 50 a) Incubar polipéptidos en una solución que comprende iones cianato, en el que los iones cianato están presentes en una concentración en el intervalo desde aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mmol/l, a temperaturas en el intervalo desde aproximadamente temperatura ambiente a aproximadamente 96 °C y un tiempo de incubación de aproximadamente varios minutos hasta varios días, e
 - b) incubar APC con los polipéptidos de la etapa a) en presencia de urea y en ausencia o presencia de sustancias inmunomoduladoras, en el que los linfocitos T específicos de polipéptidos son preferentemente linfocitos T CD4⁺ y/o linfocitos T CD8⁺.
- 55 8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los iones cianato están presentes en una concentración en el intervalo desde aproximadamente 5 mmol/l a aproximadamente 900 mmol/l, desde aproximadamente 10 mmol/l a aproximadamente 800 mmol/l, desde aproximadamente 20 mmol/l a

aproximadamente 700 mmol/l, desde aproximadamente 50 mmol/l a aproximadamente 600 mmol/l o desde aproximadamente 100 mmol/l a aproximadamente 500 mmol/l.

5 9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la solución de la etapa a) comprende adicionalmente urea, preferentemente en el intervalo desde aproximadamente 0,01 mol/litro a aproximadamente 8 mol/litro, desde aproximadamente 0,1 mol/litro a aproximadamente 0,5 mol/litro, desde aproximadamente 0,5 mol/litro a aproximadamente 5 mol/litro o desde aproximadamente 5 mol/litro a aproximadamente 8 mol/litro.

10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la urea se ha pre-tratado por incubación, en el que los parámetros de incubación son preferentemente el calor y/o el tiempo.

10 11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la concentración de urea en la etapa b) está en el intervalo desde aproximadamente 0,001 mol/litro a aproximadamente 0,8 mol/l, desde aproximadamente 0,01 mol/l a aproximadamente 0,1 mol/l, desde aproximadamente 0,015 mol/l a aproximadamente 0,09 mol/l, desde aproximadamente 0,02 mol/l a aproximadamente 0,08 mol/l, desde aproximadamente 0,025 mol/l a aproximadamente 0,07 mol/l, desde aproximadamente 0,03 mol/l a
15 aproximadamente 0,06 mol/l o desde aproximadamente 0,035 mol/l a aproximadamente 0,05 mol/l y en particular en el que la concentración de urea en la etapa b) es de aproximadamente 0,04 mol/l.

12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la solución de urea contiene adicionalmente NaCl con una concentración en el intervalo de desde 0,25 mmol/l a aproximadamente 200 mmol/l, o desde aproximadamente 0,25 mmol/l a aproximadamente 75 mmol/l y/o DTE o DTT con una concentración en el intervalo desde aproximadamente 0,25 nmol/l a aproximadamente 200 nmol/l, o desde aproximadamente 0,25 nmol/l a aproximadamente 75 nmol/l.

13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los polipéptidos en

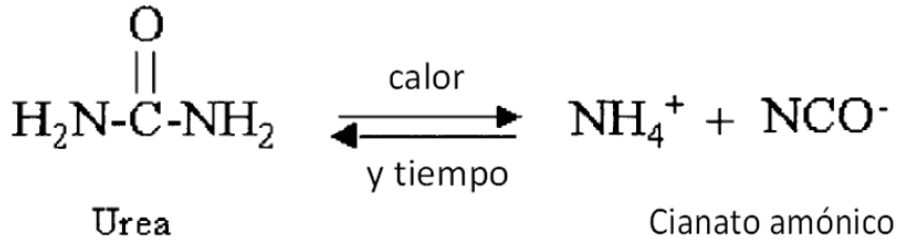
25 (i) la etapa a) están presentes en una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 µg/ml, desde aproximadamente 1 a aproximadamente 40 µg/ml, desde aproximadamente 3 a aproximadamente 30 µg/ml, o desde aproximadamente 5 a aproximadamente 20 µg/ml y en particular en una concentración de aproximadamente 10 µg/ml; y/o

30 (ii) la etapa b) están presentes en una cantidad en el intervalo desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 µg o mayor, o desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 µg, o desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 µg, o desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 µg, o desde aproximadamente 10 a aproximadamente 50 µg o desde aproximadamente 50 a aproximadamente 200 µg para aproximadamente 10⁶ células.

14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la incubación de los polipéptidos en la etapa a) da como resultado un aumento del peso molecular de los polipéptidos y/o un cambio
35 en el valor del pK_i de los polipéptidos a un valor de pK_i más ácido.

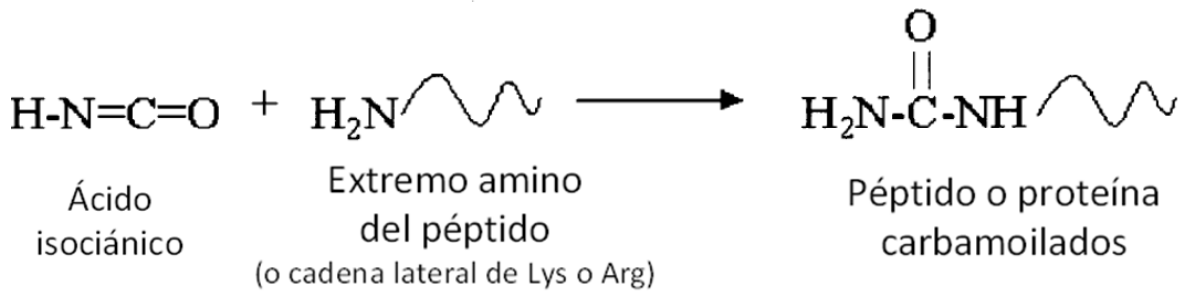
Fig. 1

Descomposición de urea



Carbamoilación de proteínas

se utiliza el extremo amino de un péptido como ejemplo



Aminoácido	Composición del resto	Masa monoisotópica del resto	Masa delta
Lisina	C ₆ H ₁₂ N ₂ O	128,09496	0
Carbamoil Lisina	C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₂	171,10078	43,00582
Carbamoilación	*NHCO	43,00582	-

*Nota: Se pierde un protón del grupo a amino de la proteína durante la carbamoilación y así el cambio en la composición es NHCO.

<http://ionsource.com/Card/carbam/carbam.htm>

Fig. 2

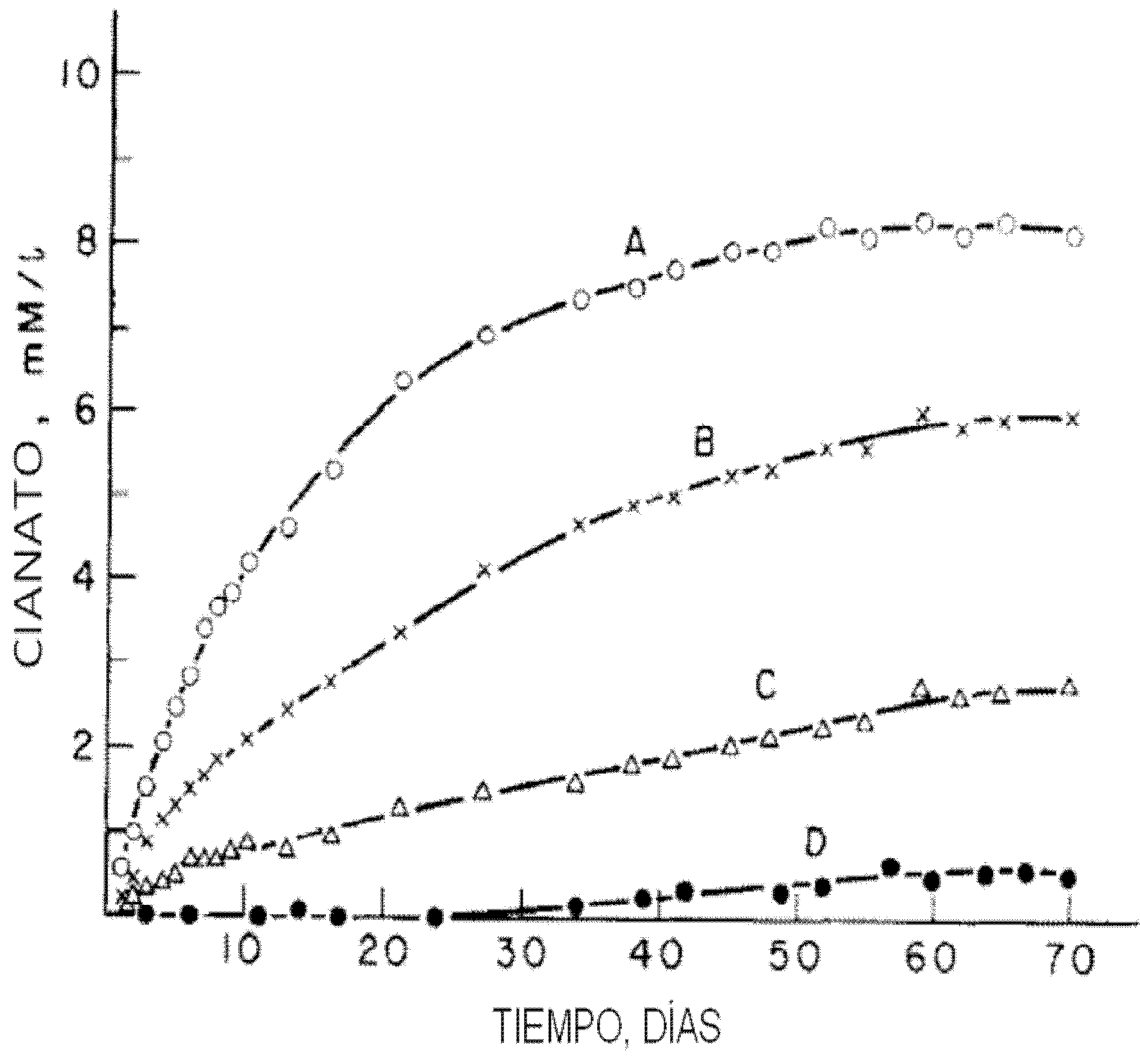


Fig. 3

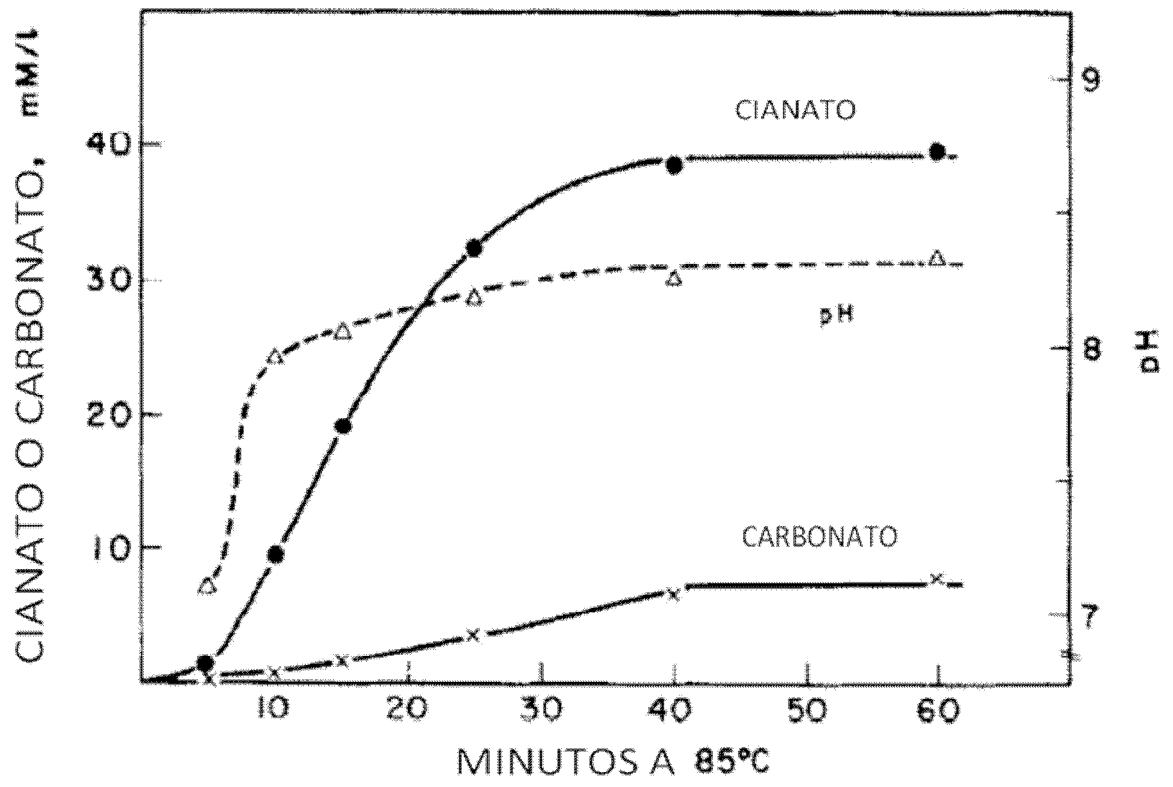


Fig. 4

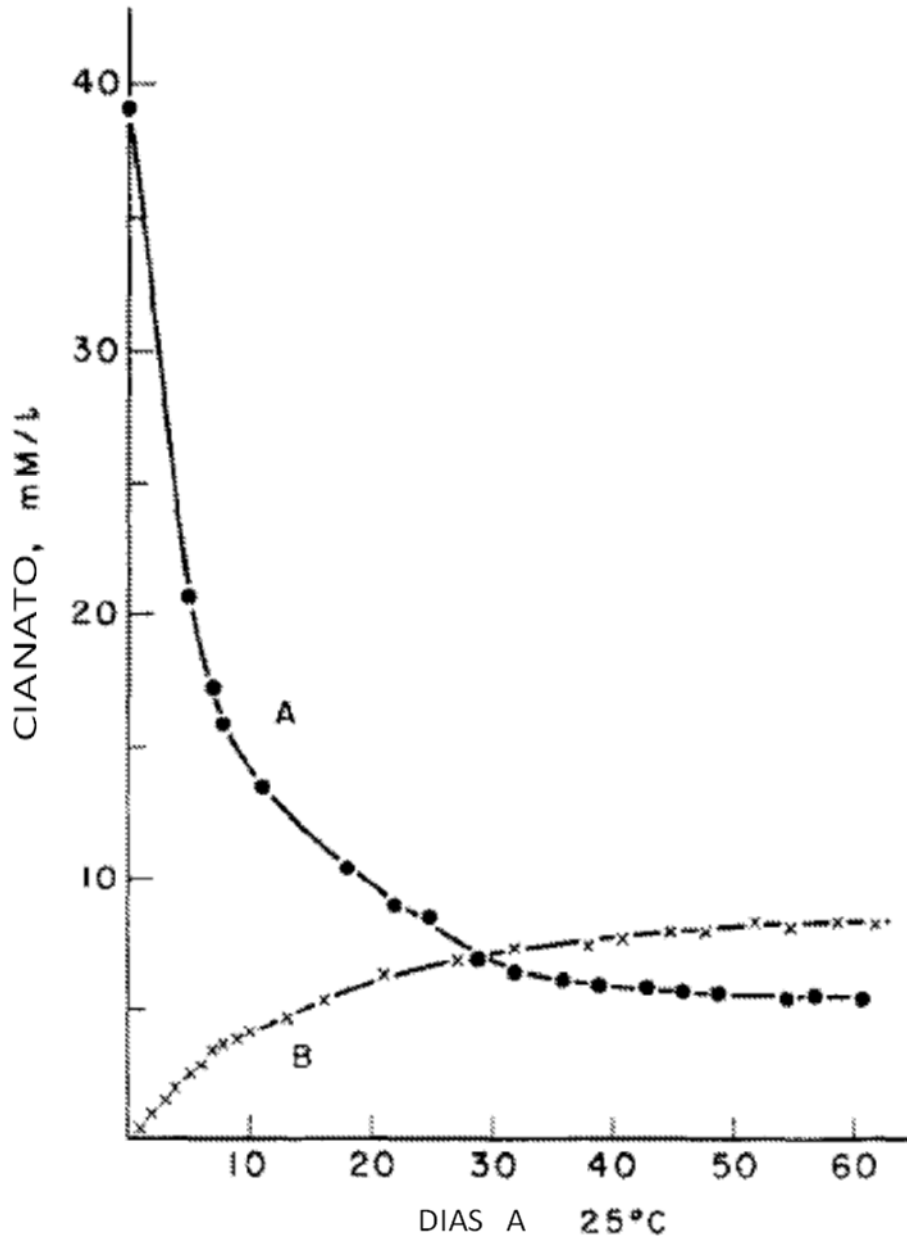
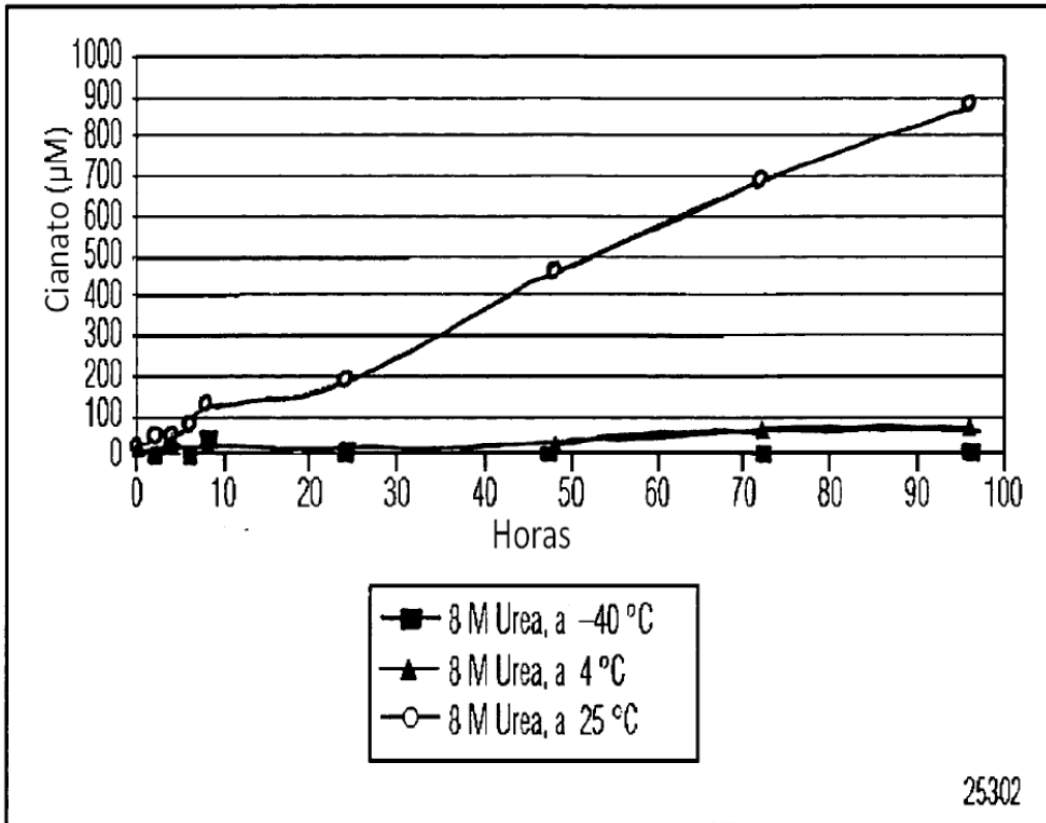


Fig. 5



Christison et al, „Direct Determination of Cyanate in a Urea Solution and a Urea Containing Protein Buffer Using a Reagent-Free Ion Chromatography System“, Dionex (www.dionex.com)

Fig. 6

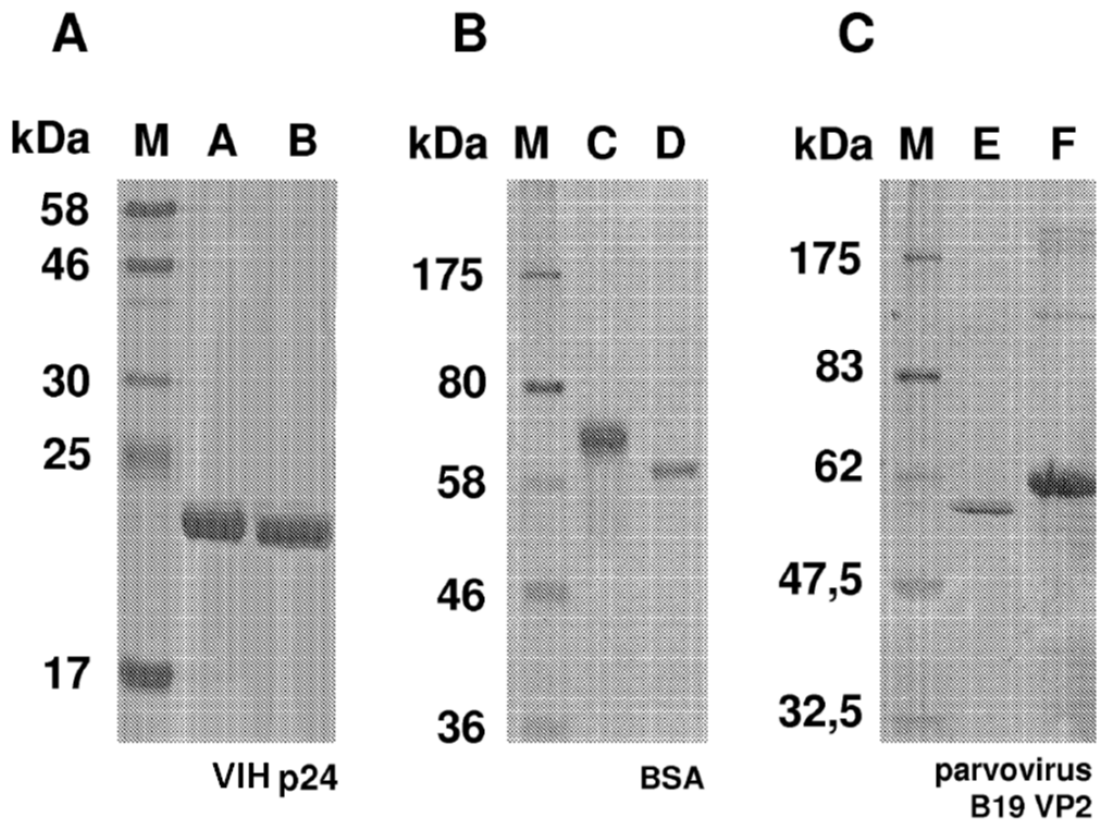


Fig. 7

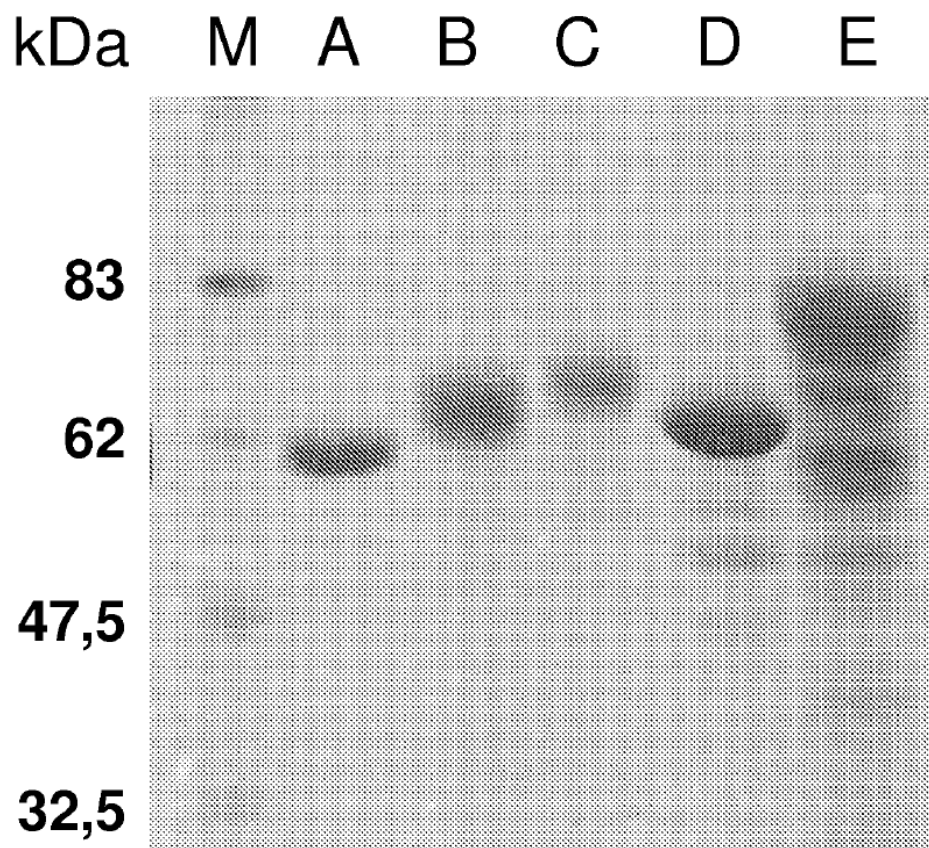


Fig. 8

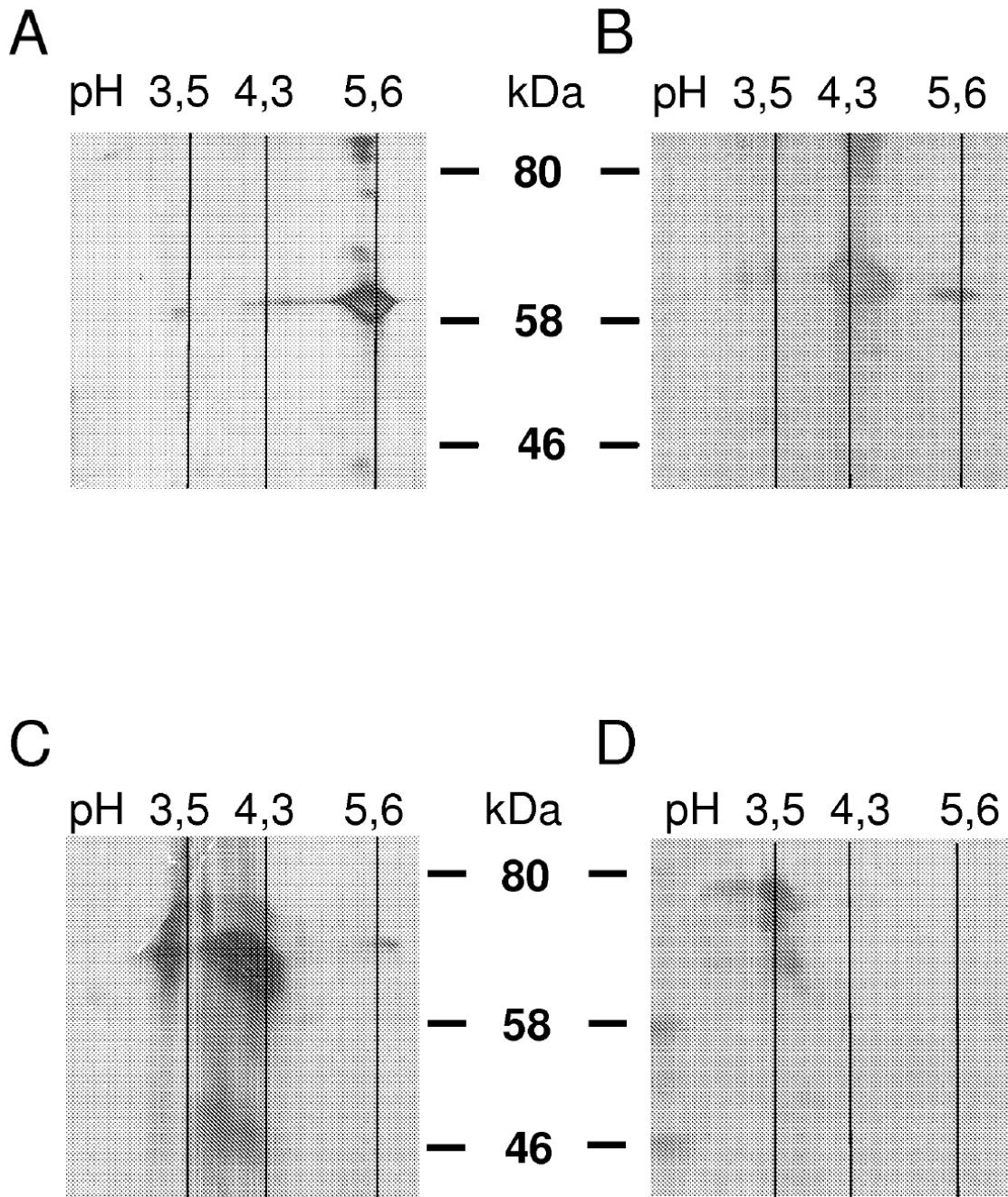


Fig. 9

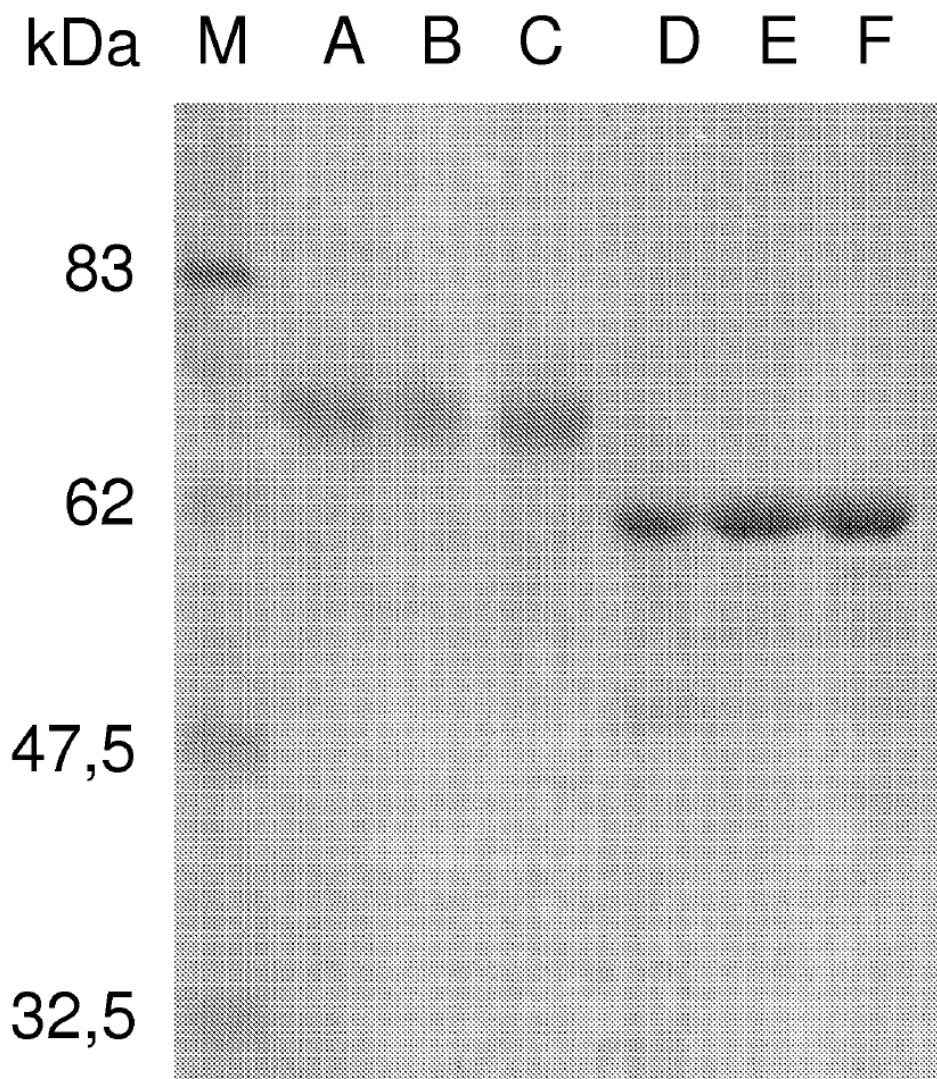


Fig. 10

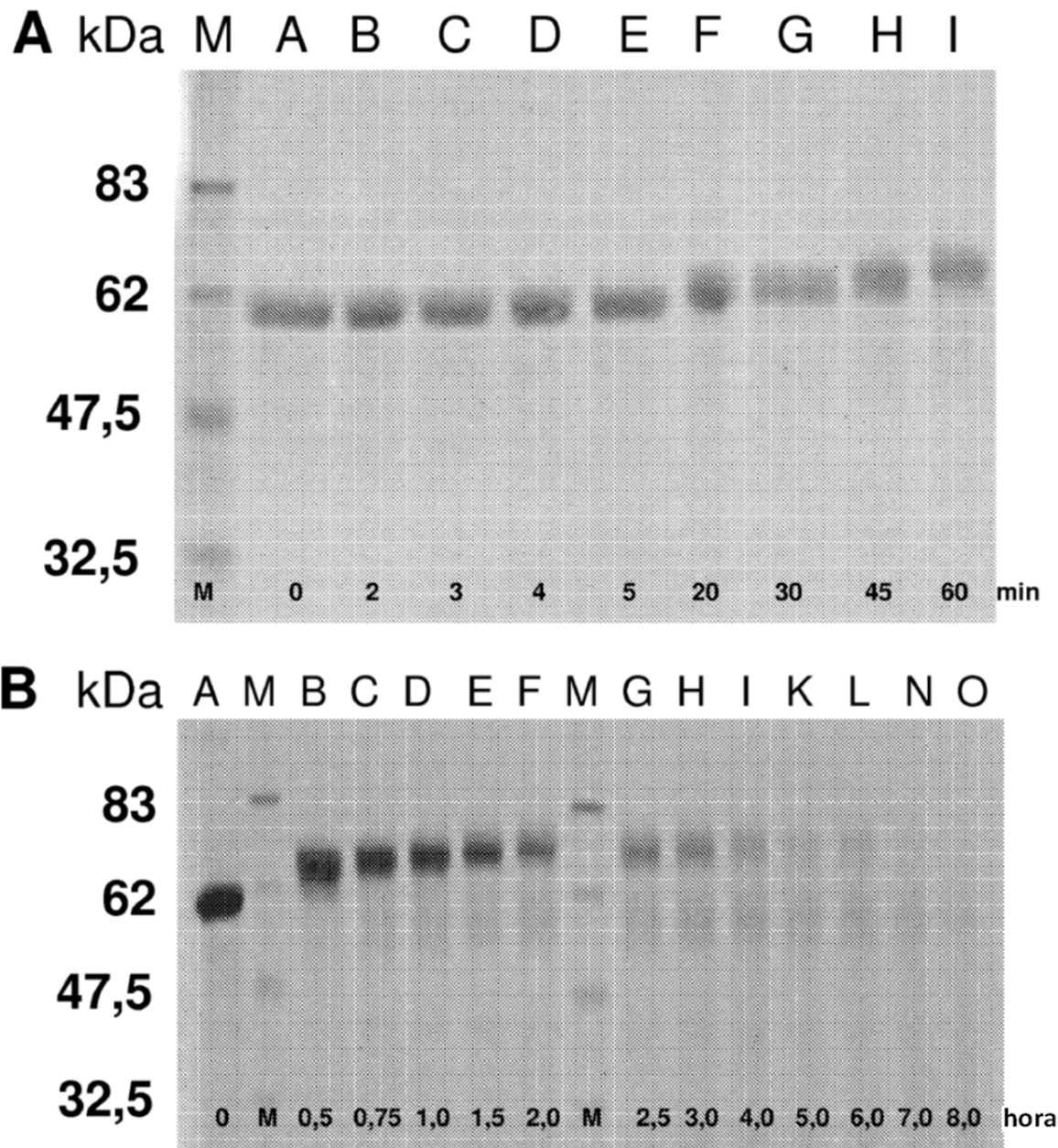


Fig. 11

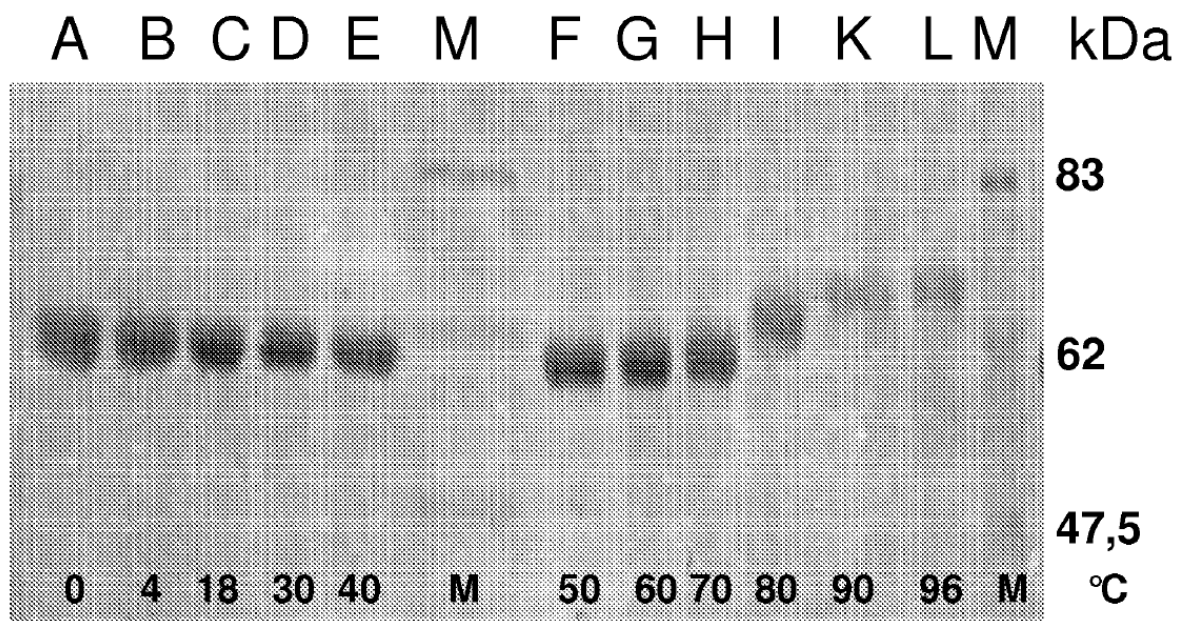
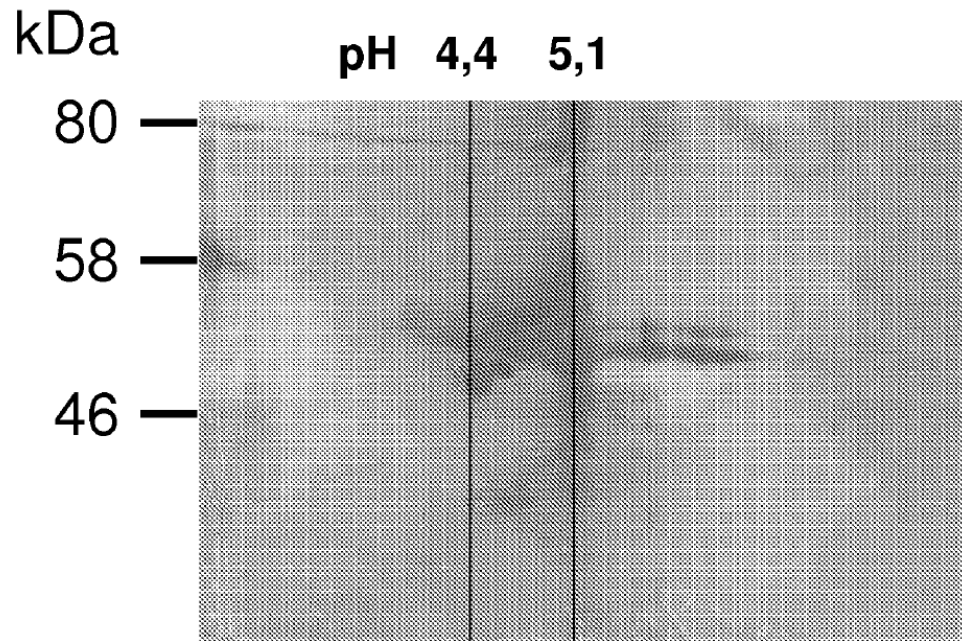
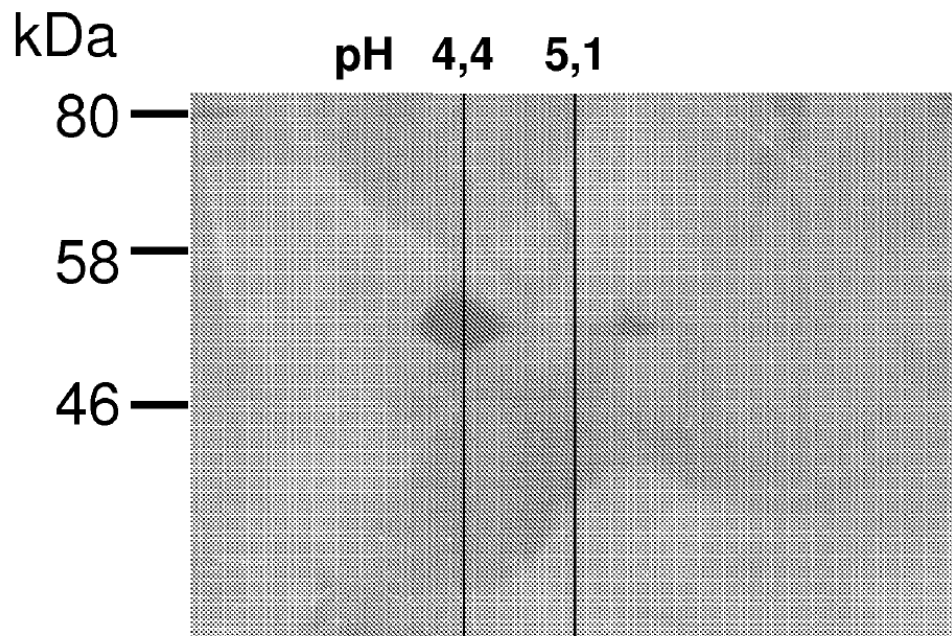


Fig. 12

A



B



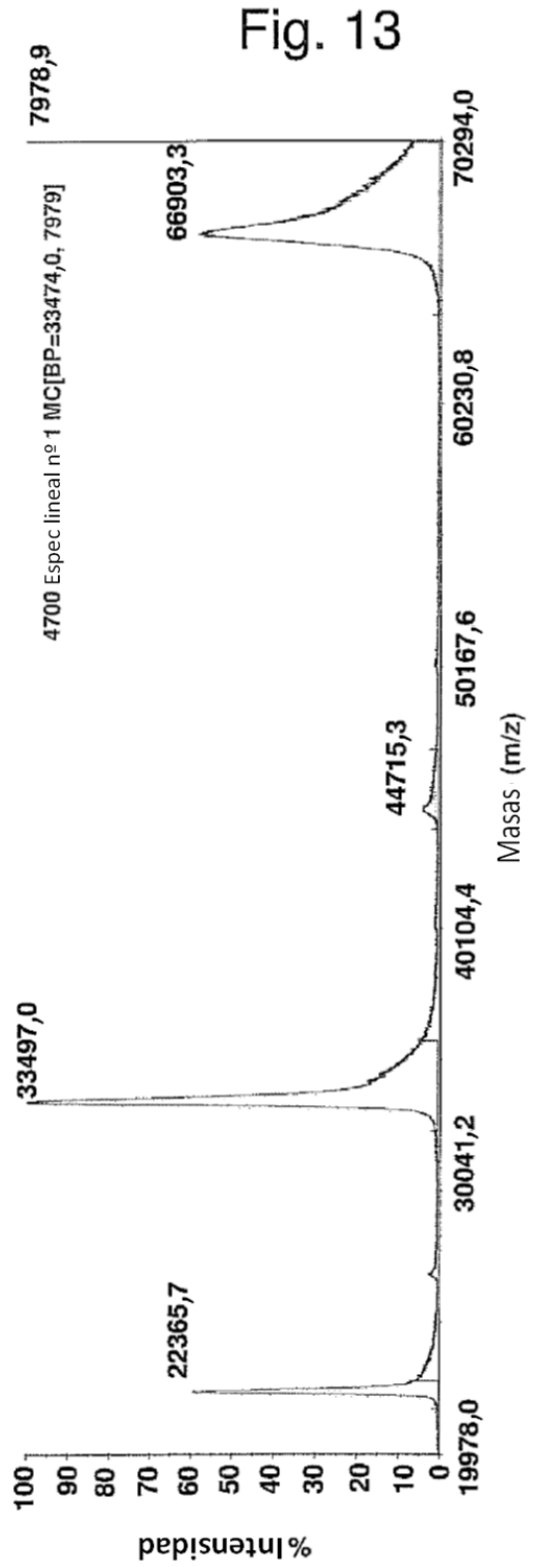
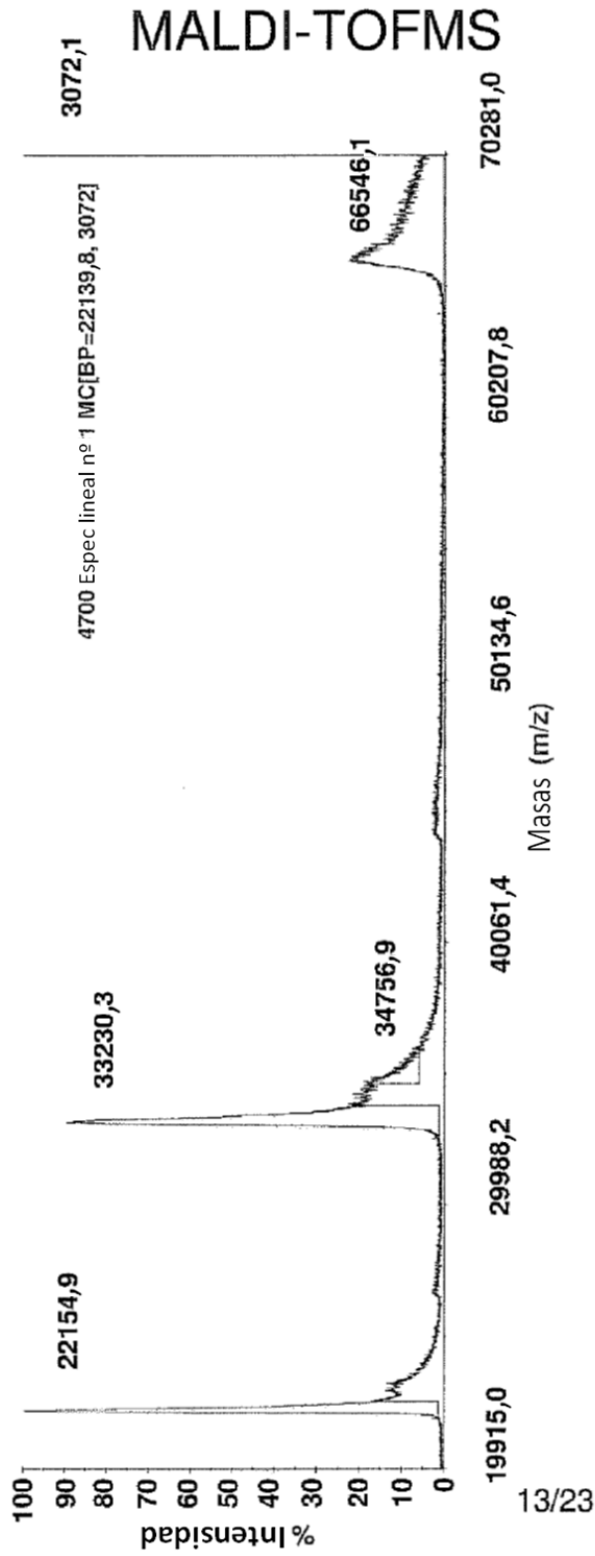


Fig. 14

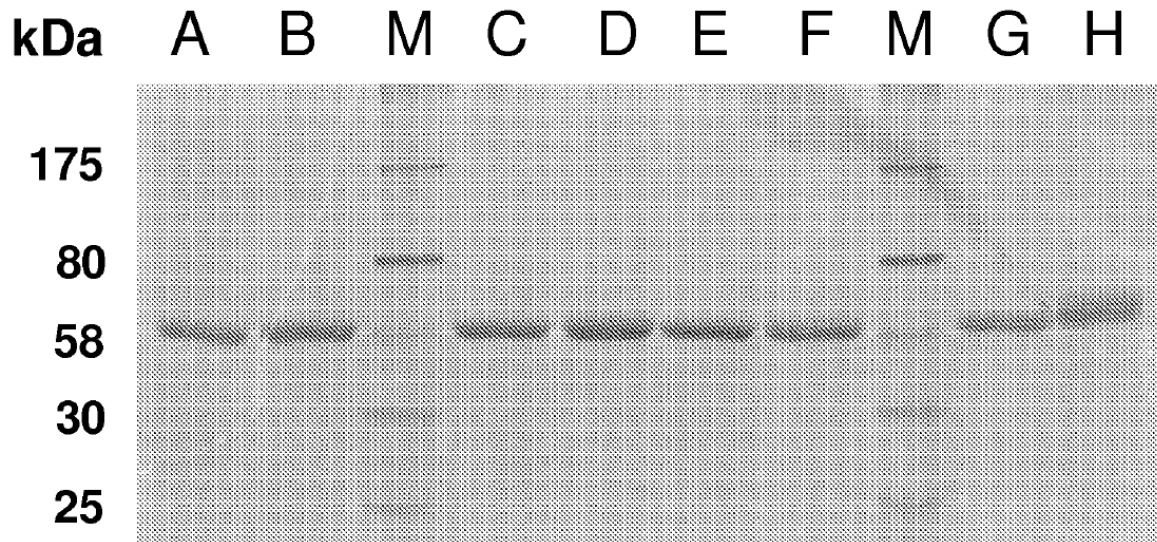


Fig. 15

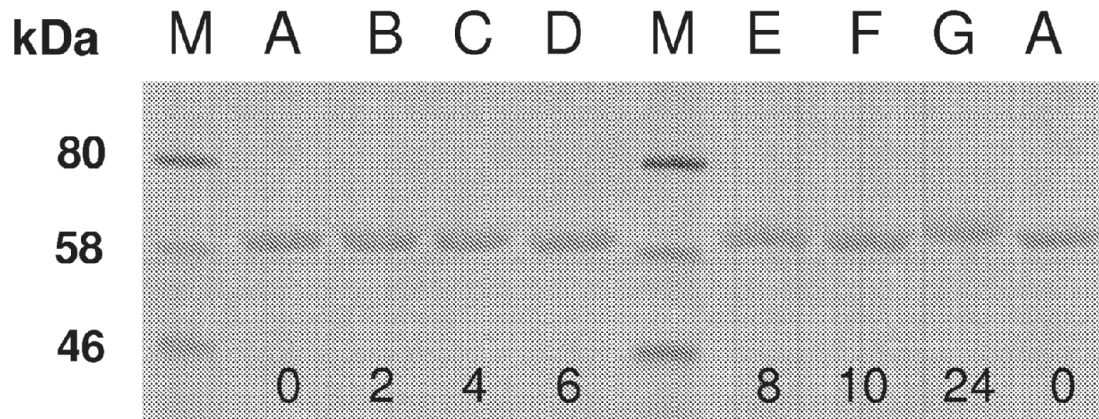


Fig. 16

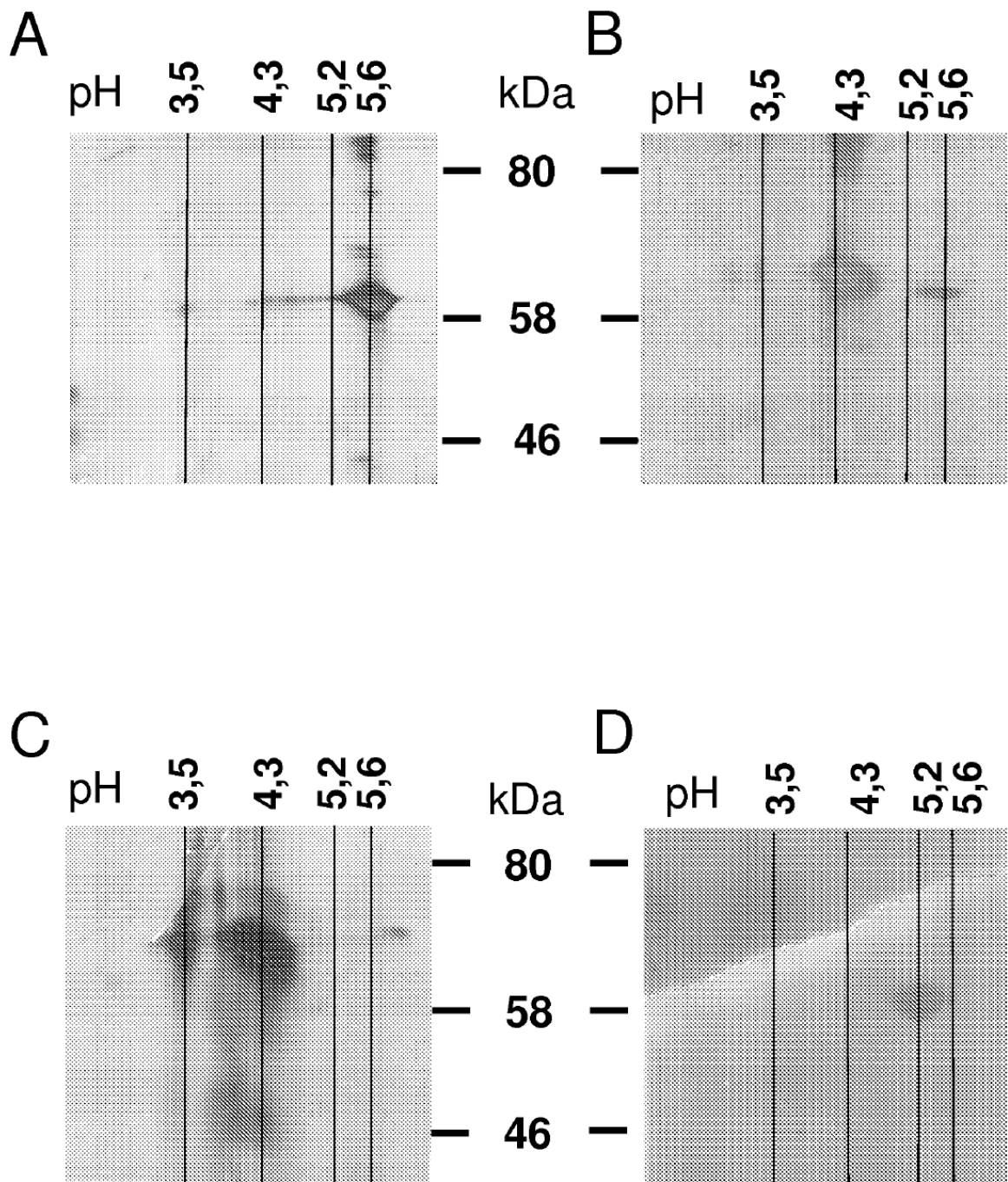


Fig. 17

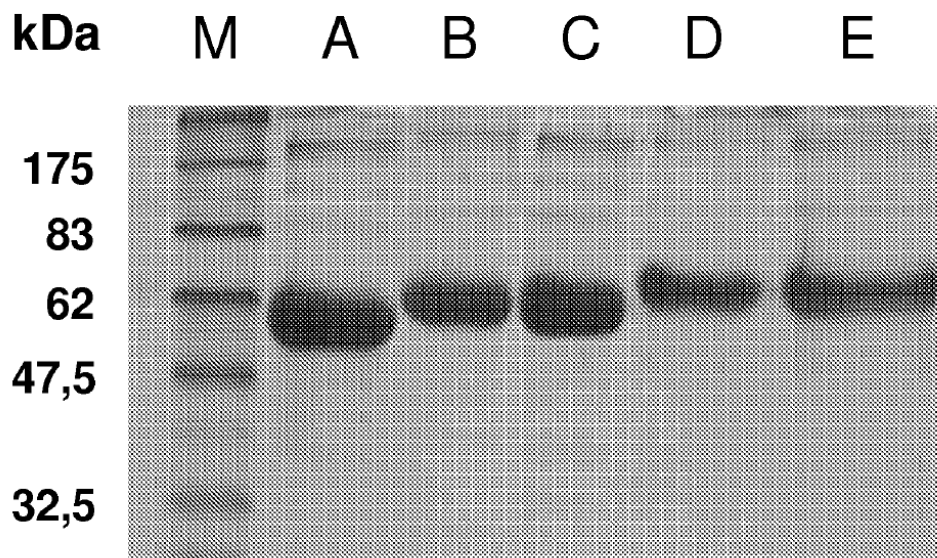
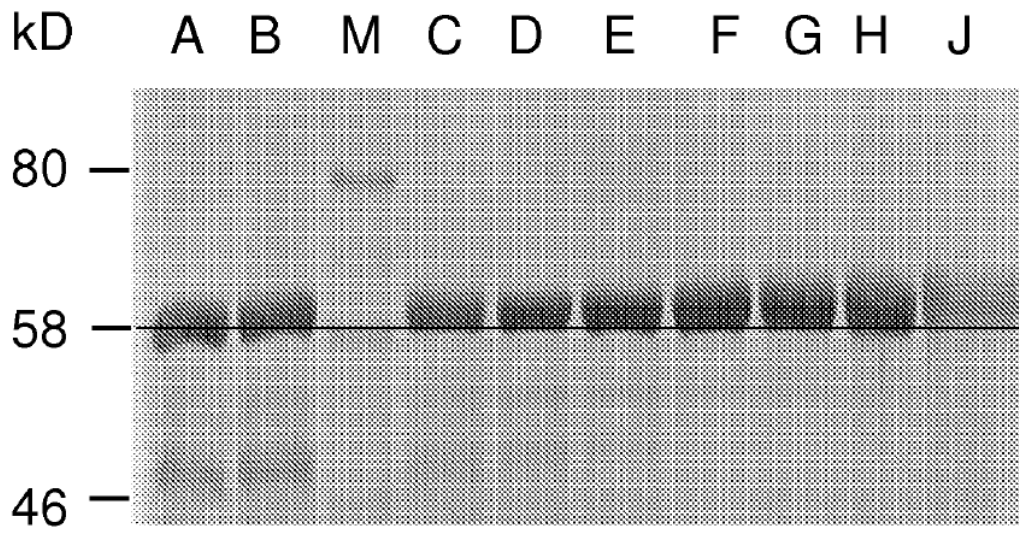


Fig. 18



Fia. 19

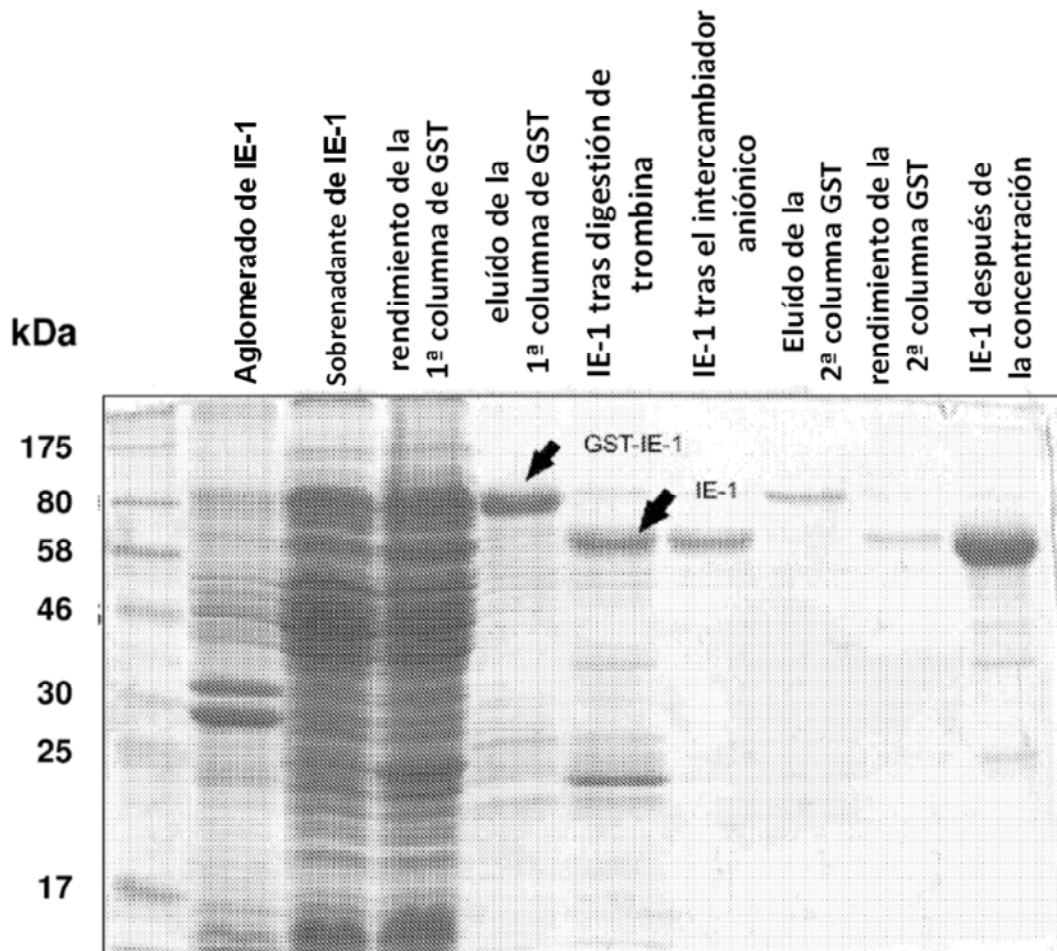


Fig. 20

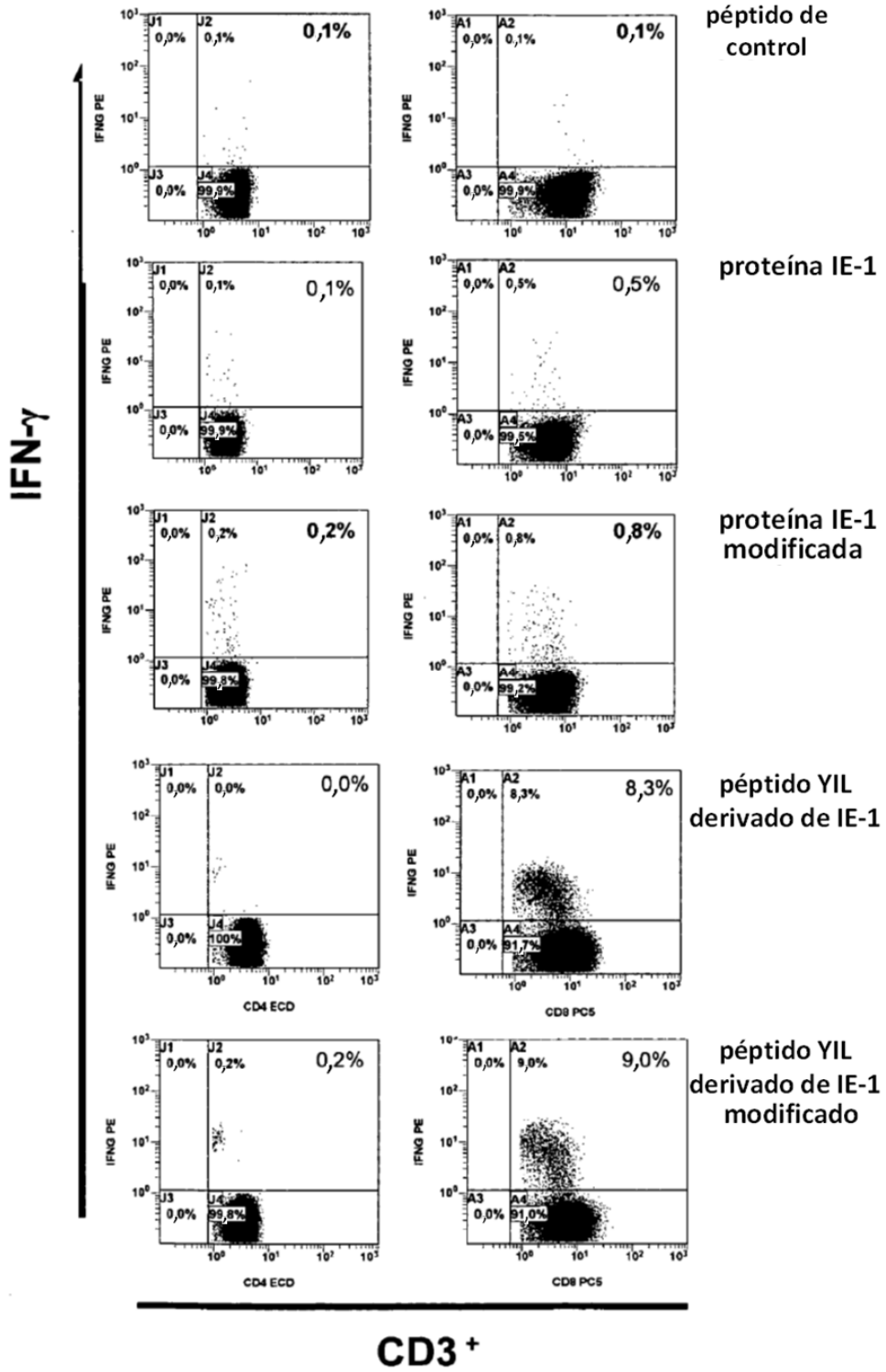


Fig. 21

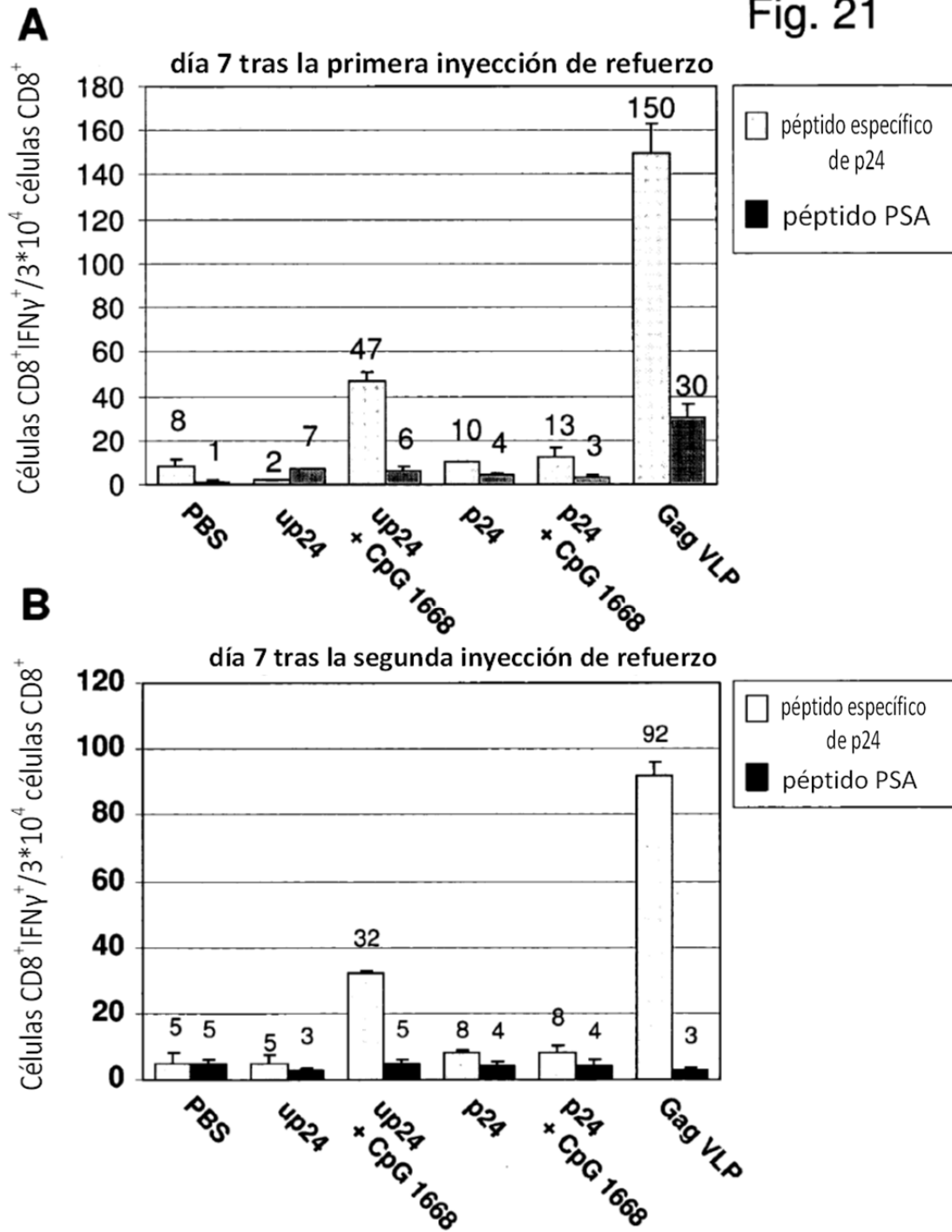


Fig. 22

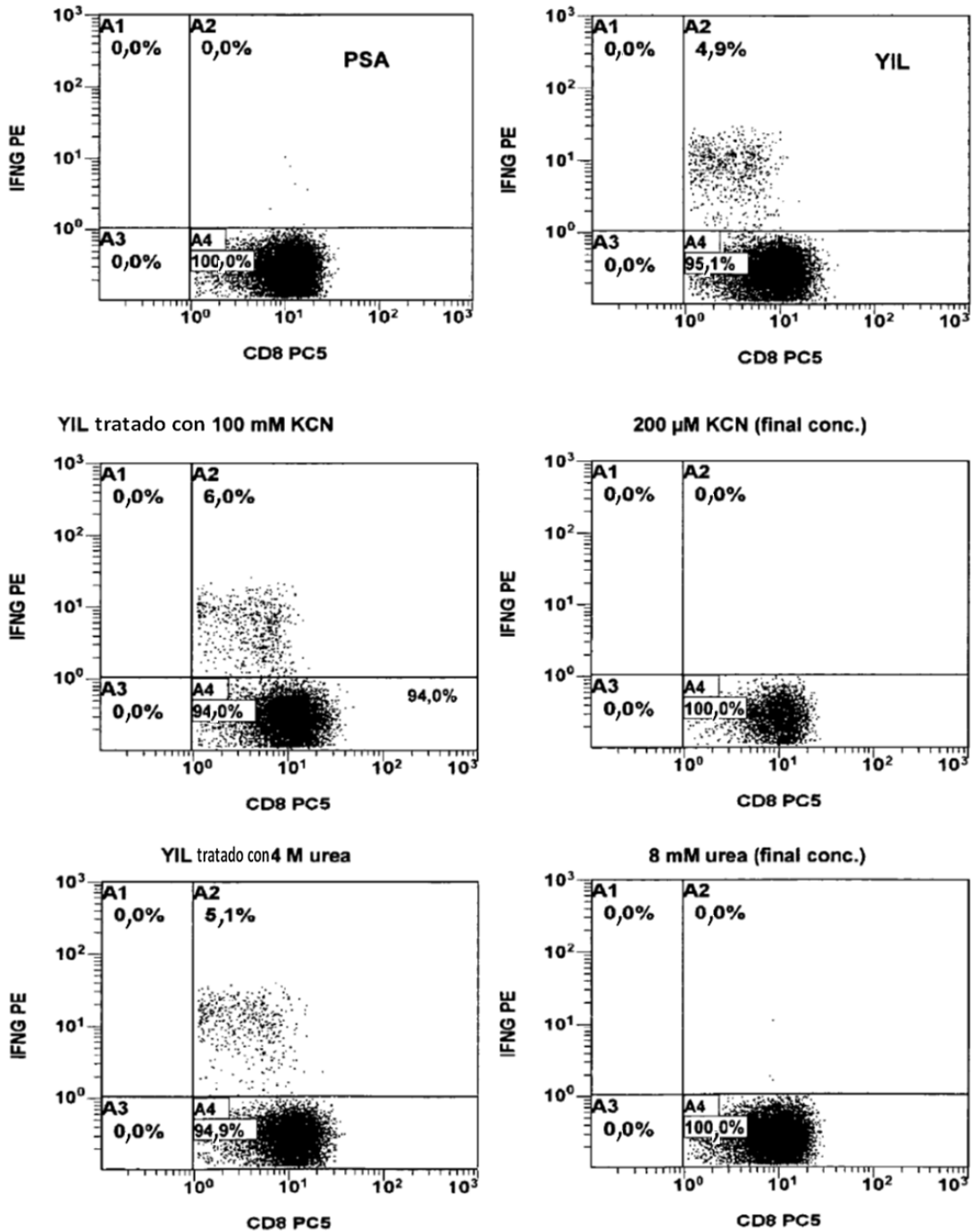


Fig. 23

