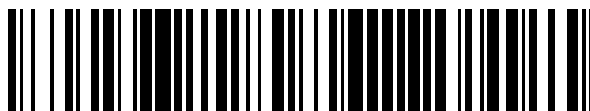


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 357**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2002 E 10178826 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 2336167**

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

30 Prioridad:

14.03.2001 DK 200100435

14.03.2001 DK 200100436

14.03.2001 DK 200100441

14.03.2001 US 275470 P

14.03.2001 US 275448 P

14.03.2001 US 275447 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2020

73 Titular/es:

DAKO DENMARK A/S (50.0%)

Produktionsvej 42

2600 Glostrup , DK y

IMMUDEX APS (50.0%)

72 Inventor/es:

WINTHER, LARS;

PETERSEN, LARS OESTERGAARD;

BUUS, SØREN;

SCHOELLER, JØRGEN;

RUUD, ERIK y

AAMELLEM, OEYSTEIN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 747 357 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

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

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

Antecedentes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ciertamente, el éxito de las inmunoterapias que interfieren sustancialmente con la función de células ha sido limitado,

pero se cree continuamente que ésta sería una forma de tratar un amplio intervalo de enfermedades graves, incluyendo cáncer y enfermedades autoinmunes.

El documento EP0352761 desvela construcciones de antígeno que resultan del enlace de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad Clase I a moléculas vehículo específicas. Las moléculas vehículo específicas se unen selectivamente a células diana y son preferentemente anticuerpos monoclonales.

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

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

El documento EP0636696 describe un proceso para producir una proteína de antígeno mayor de histocompatibilidad clase II; un material que tiene la MHC clase II inmovilizada en él, preparado uniendo la MHC clase II, las subunidades alfa y/o beta de la MHC clase II, o una parte de las mismas a un material tal como una perla, fibra o hilo hueco a través de enlace covalente; y un módulo de retirada de superantígeno preparado a partir del material.

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

El documento WO0023053 se dirige a células presentadoras de antígeno artificiales y métodos para preparar células presentadoras de antígeno artificiales. Dichas células presentadoras de antígeno artificiales pueden usarse en determinados métodos para aislar y expandir poblaciones de células T así como para modular respuestas de células T.

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

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

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

Sumario

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier realización que no caiga bajo el alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención.

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

En el presente documento se muestra (véanse los Ejemplos) que estas construcciones de moléculas MHC se unen con una avidéz mucho mayor a células T específicas de antígeno que los tetrámeros conocidos de la técnica anterior en condiciones comparables. La energía de unión inesperada y sorprendentemente aumentada, derivada a través de una mayor valencia de los compuestos, permite la tinción específica y eficiente de poblaciones de células T incluso sutiles, por ejemplo, en células de sangre periférica, por ejemplo, usando citometría de flujo (véanse los Ejemplos).

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a nuevas construcciones de moléculas MHC que

comprenden una molécula vehículo que tiene unida a ella una o más moléculas MHC, estando unidas dichas moléculas MHC a la molécula vehículo bien directamente o mediante una o más entidades de unión.

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

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

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

Las construcciones de moléculas MHC son muy adecuadas como sistemas de detección. Así, la presente divulgación se refiere al uso de las construcciones de moléculas MHC como se define en el presente documento como sistemas de detección.

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

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

Como se ha mencionado anteriormente, la presente divulgación también se refiere generalmente al campo de la terapia. Así, la presente divulgación se refiere en sí misma a la construcción de moléculas MHC como se define en el presente documento para uso como medicamentos, y a las construcciones de moléculas MHC para uso en terapia *in vivo* y *ex vivo*.

La presente divulgación se refiere a composiciones terapéuticas que comprenden como principios activos las construcciones de moléculas MHC como se define en el presente documento.

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

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

La divulgación también se refiere a métodos para obtener células que reconocen MHC usando las construcciones de moléculas MHC como se describe en el presente documento.

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

Breve descripción de las figuras

A continuación se proporciona una descripción breve de las Figuras.

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

La Figura 25-33 ilustran algunas de las aplicaciones de las construcciones de moléculas MHC incluyendo especificidad, efecto de tamaño, tiempo de incubación, dependencia de concentración, curso de tiempo de disociación de la unión, inhibición de la unión por anticuerpos, efecto de la proporción HLA (MHC humano) a

dextrano en la ligación en la unión específica, así como capacidad para teñir subpoblaciones de células T, véanse los Ejemplos. Así, se demuestra la utilidad de las construcciones de moléculas MHC en aplicaciones clínicas prácticas.

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

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

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

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

Figura 2. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una cargada con un péptido, unidas mediante entidades de unión marcadas a una molécula vehículo.

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

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

Figura 5. Construcción de moléculas MHC que comprende diferentes moléculas MHC, cargadas con diferentes péptidos, unidas mediante entidades de unión a una molécula vehículo marcada.

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

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

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

Figura 9. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una cargada con péptido, unidas directamente a una molécula vehículo. Las moléculas MHC están marcadas.

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

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

Figura 12. Construcción de moléculas MHC que comprende moléculas MHC, cargadas con diferentes péptidos, unidas directamente a una molécula vehículo. Las moléculas MHC están marcadas.

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

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

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

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

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

Figura 18. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una cargada con péptido marcado, unidas mediante entidades de unión que son anticuerpos y/o antígenos específicos a una molécula vehículo.

Figura 19. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una cargada con péptido, unidas mediante entidades de unión que son anticuerpos y/o antígenos específicos a una molécula vehículo. Anticuerpos secundarios/antígenos marcados se unen a los anticuerpos/antígenos de la entidad de unión.

Figura 20. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una cargada con péptido, unidas mediante entidades de unión que son anticuerpos y/o antígenos específicos y marcados a una molécula vehículo. Anticuerpos secundarios/antígenos marcados se unen a los anticuerpos/antígenos de la entidad de unión. El marcador puede ser el mismo o diferente.

Figura 21. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una cargada con péptido, unidas mediante entidades de unión marcadas con hapteno, a una molécula vehículo. Los anticuerpos marcados se unen a los haptenos en las entidades de unión.

Figura 22. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cada una cargada con péptido, unidas directamente a una molécula vehículo marcada con hapteno. Los anticuerpos secundarios marcados se unen a los haptenos en la molécula vehículo.

Figura 23. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples moléculas MHC, cargadas con diferentes péptidos, unidas directamente a una molécula vehículo marcada con hapteno. Los anticuerpos secundarios marcados se unen a los haptenos en la molécula vehículo.

Figura 24. Construcción de moléculas MHC que comprende múltiples y diferentes moléculas MHC, cada una cargada con péptido, unidas directamente a una molécula vehículo marcada con hapteno. Los anticuerpos secundarios marcados se unen a los haptenos de la entidad de unión.

Figura 25. Análisis de citometría de flujo de la unión de construcciones de moléculas MHC poli-ligando específicas de MART-1 de la divulgación y tetrámeros de moléculas MHC específicos de MART-1 a clones de células T específicos. Los datos se presentan como intensidad de tinción de células T viables como una función de concentraciones crecientes de construcciones de moléculas MHC poli-ligando y tetrámeros de moléculas MHC, respectivamente. La Figura 25A muestra la especificidad en la unión de tetrámeros PE-A2-MART-1 a los clones de células T específicos de MART-1 y gp100 5/127 y 5/130. La Figura 25B muestra el efecto del tamaño de la molécula vehículo en la unión de construcciones de moléculas MHC poli-ligando A2-MART-1 FITC al clon de células T 5/127.

Figura 26. Análisis de citometría de flujo de la unión de construcciones de moléculas MHC poli-ligando y tetrámeros de moléculas MHC a una línea de células T específica de gripe que ilustra la tinción específica y dependiente de la dosis. Figura 26A: Unión de tetrámeros marcados con PE a una línea de células T específica de gripe. Figura 26B: Unión de construcciones de moléculas MHC poli-ligando marcadas con FITC a una línea de células T específica de gripe.

Figura 27. Análisis de citometría de flujo comparativo de la tinción dependiente de tiempo y concentración por construcciones de moléculas MHC poli-ligando de la divulgación y tetrámeros de moléculas MHC al clon de células T 5/127. Figura 27A: Unión dependiente de tiempo de los tetrámeros MART1-A2 marcados con PE a concentraciones de tetrámero de 14 a 112 nM. Figura 27B: Unión dependiente de tiempo de construcciones de moléculas MHC poli-ligando MART1-A2 marcadas con FITC a concentraciones de 2 a 16 nM.

Figura 28. Análisis de citometría de flujo del efecto de la temperatura en la disociación de construcciones de moléculas MHC poli-ligando A2-MART-1 de la divulgación unidas a células del clon de células T 5/127. El efecto se estudió a 4 °C, 22 °C y 37 °C, respectivamente.

Figura 29. Análisis de citometría de flujo de la inhibición de la unión de la construcción de moléculas MHC poli-ligando A2-MART-1 al clon de células T 5/127 por anticuerpos monoclonales dirigidos frente a la proximidad del sitio de unión del péptido. Figura 29A: Se ensayó el efecto de los anticuerpos siguientes: BB7.2, específico de HLA A0201; W6/32, específico general de HLA A, B, C; BBM1, específico de β_2m . Todos los anticuerpos se usaron a una concentración de 10 nM. bck: Valor de fondo, -mab: sin tratamiento con anticuerpo. Figura 29B: Ensayo de concentraciones crecientes de los dos anticuerpos monoclonales: anticuerpo BBM1 (específico de β_2m) y

anticuerpo anti-CD8 de células T humanas de ratón.

Figura 30. Análisis de citometría de flujo de la unión de la construcción poli-ligando HLA Clase I al clon de células T 5/127 que muestra el efecto de variaciones en la proporción HLA a dextrano en el proceso de ligación. Se ensayaron los dextrans de 150, 270 y 500 kDa.

Figura 31. Diagrama de citometría de flujo que muestra el análisis de una subpoblación de células T específica del péptido A2-MART-1 de 5 % teñida con: (A) molécula MART-1/HLA tetrámero marcada con PE a una concentración de 15 nM. (B) construcción de moléculas MART-1/HLA poli-ligando marcada con FITC a una concentración de 3 nM. La población de células T se obtuvo mezclando los dos clones de células T 5/127 (específico de MART-1) y el 5/130 (específico de gp100).

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

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

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

La Figura 35 indica proteínas interesantes de VIH/SIV.

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

La Figura 37 indica epítomos CTL de VIH interesantes.

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

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

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

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

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

Figura 43. Fotografía de microscopio de campo brillante de una tinción *in situ* con cromógeno AEC de células T en tejido de melanoma positivo para HLA A0201 con construcción de moléculas MHC marcada con HRP poli-ligando análogo de péptido MART-1 (ELAGIGILTV). Se usaron diferentes reactivos de bloqueo de peroxidasa endógena. Figura 43A: solución peróxido/metanol, y Figura 43B: solución de bloqueo de peroxidasa DAKO. Las células positivas se colorean de rojo.

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

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

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

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

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

La Figura 49 muestra una realización de la presente divulgación en donde la construcción de moléculas MHC de la divulgación comprende moléculas HLA cargadas con péptido. Aquí, la construcción de moléculas MHC se acopla (o inmoviliza) directamente en un soporte sólido o semi-sólido en este caso perlas o partículas.

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

La Figura 51 muestra una realización de la presente divulgación en donde la construcción de moléculas MHC de la divulgación comprende moléculas HLA cargadas con péptido. Aquí, la construcción MHC de la presente divulgación se acopla (o inmoviliza) en un soporte sólido o semi-sólido en este caso perlas o partículas usando una unión de anticuerpo a la molécula vehículo.

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

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

La Figura 54 muestra una realización de la presente divulgación en donde la construcción de moléculas MHC de

la divulgación comprende moléculas HLA cargadas con péptido y moléculas co-estimuladoras. Aquí, la construcción MHC de la presente divulgación se acopla (o inmoviliza) en un soporte sólido o semi-sólido en este caso perlas o partículas mediante biotina-avidina.

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

Descripción detallada

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

El sistema inmune y las moléculas MHC

El sistema inmune puede verse como uno de los sistemas bioinformáticos naturales principales. Evalúa cualquier sustancia que entra en el entorno interno, determina su naturaleza y decide si actuar frente a ella. Las proteínas y péptidos son los medios más importantes para obtener y transportar dicha información inmune. Desde este punto de vista, la molécula MHC codifica el grupo más esencial de moléculas requeridas para el reconocimiento de antígenos inmunogénicos. Las moléculas MHC muestrean el metabolismo proteico completo para información peptídica y hacen que esta información esté disponible para la unidad de reconocimiento central del sistema inmune, la célula T.

Sin embargo, estas células efectoras requieren una interacción sustancial entre la molécula MHC y los TCR para mantener una transducción de señal apropiada. Se ha mostrado (ref. 3) las al menos dos señales que se requieren para la activación de células T sin estimular: Una señal surge por la interacción molecular entre las moléculas MHC y TCR, mientras la otra señal deriva de la ligación de ligandos co-estimuladores, por ejemplo, B7-1 y sus contra receptores, por ejemplo, CD28. También se ha mostrado que otras moléculas, por ejemplo, receptores NK, pueden regular el umbral de activación de las células T. Así, la activación completa de las células T y otras células efectoras inmunes competentes requiere una acción orquestada de múltiples ligandos; se podría decir que las respuestas inmunes están bajo el control de compuestos poli-ligando.

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

Las células del sistema inmune

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

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

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

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

15 Las células T comprenden dos subpoblaciones principales. Las células T citolíticas atacan directamente células infectadas, extrañas, o cancerosas que presentan formas extrañas o aberrantes de péptidos endógenos en el contexto de las moléculas MHC Clase I (descrito más adelante). Las células T "auxiliares" que se activan por péptidos exógenos extraños en las moléculas MHC Clase II, contribuyen a la regulación de la respuesta inmune mediante la señalización de otros defensores del sistema inmune. Las células T también funcionan produciendo proteínas denominadas linfocinas.

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

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

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

35 Las citocinas son sustancias producidas por algunas células inmunes para comunicarse con otras células. Los tipos de citocinas incluyen linfocinas, interferones, interleucinas, y factores estimuladores de colonias.

Reconocimiento de antígeno por células B y T

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

Restricción de MHC e inmunidad de células T

60 Las células T determinan la reactividad y especificidad del sistema inmune adaptativo, incluyendo la actividad de las células B. Por lo tanto, es apropiado centrar la atención en estas células. Las células T sólo pueden reconocer un antígeno dado, cuando se presenta en el contexto de una molécula MHC particular. Se "educan" durante la ontogenia y se activan adicionalmente durante el primer cebado en procesos designados para desarrollar células T que portan receptores específicos para una combinación particular antígeno-molécula MHC. Estas células T posteriormente sólo son capaces de reconocer la misma combinación antígeno-molécula MHC. Este fenómeno se conoce como

"restricción de MHC". Otro fenómeno inmune - el de "estado respondedor" - también se determina por las moléculas MHC. Los individuos de un haplotipo MHC responderán a algunos antígenos, y no a otros. Otros individuos con otros haplotipos MHC responderán de manera diferente. Estos dos fenómenos tienen una importancia obvia para cualquier manipulación inmune racional. Como se ha mencionado, ahora se sabe que las moléculas MHC controlan a ambos.

Estas moléculas han evolucionado específicamente para el propósito de la presentación de antígeno. El conocimiento actual de la presentación de antígeno puede resumirse como sigue. En primer lugar, la sustancia extraña, el antígeno, es captado por las APC. Se genera un conjunto intracelular de péptidos antigénicos mediante la fragmentación proteolítica de todas las proteínas disponibles para la célula (que puede incluir tanto proteínas celulares normales ("proteínas propias") como antígenos ("proteínas no propias") de los organismos infectivos).

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

Una pluralidad de receptores está implicada en la activación específica de antígeno de las células inmunes

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

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

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

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

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

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

Existen dos subtipos de moléculas MHC, moléculas MHC Clase I y II. Estos subtipos corresponden a dos subconjuntos de linfocitos T: 1) células T citotóxicas CD8+, que habitualmente reconocen péptidos presentados por las moléculas MHC Clase I, y matan células T infectadas o mutadas, y 2) células T auxiliares CD4+, que habitualmente reconocen péptidos presentados por las moléculas MHC Clase II, y regulan las respuestas de otras células del sistema inmune. Las moléculas MHC Clase I consisten en una glicoproteína transmembrana con un PM de 43.000 (la cadena α) asociada no covalentemente con una proteína no glicosilada con un PM de 12.000 (la cadena ligera (β), también conocida como β_2 -microglobulina). Las moléculas MHC Clase II tienen una estructura global similar a las moléculas MHC Clase I aunque la distribución de dominios es diferente. La molécula MHC Clase II consiste en dos glicoproteínas transmembrana asociadas no covalentemente con un PM de aproximadamente 34.000 y 29.000. Las estructuras

detalladas de las moléculas MHC Clase I y II se han resuelto a nivel de cristalografía de rayos X, por ejemplo, por Björkman et al. (ref. 8). La parte más interesante de la estructura de la molécula MHC es la parte "superior" que muestra un surco único de unión a péptido que consiste en dos hélices alfa que forman las paredes del surco y ocho láminas beta plegadas que forman el suelo del surco.

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

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

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

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

Células NK y moléculas MHC

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

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

El receptor de las células T

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

La interacción específica de ligandos de TCR específico, es decir, complejos péptido inmunogénico/HLA y receptores de células T específicos resulta en la formación inducida por ligando de un señalosoma compuesto por el complejo

TCR/CD3 y su interacción con conjuntos intracelulares de tirosina quinasas (lck, Fyn, Syk, Zap-70) y adaptadores (LAT, TRIM y Grp2) (ref. 4). Como se ha descrito anteriormente, los TCR se expresan clonalmente y sólo complejos MHC específicos de péptido apropiados pueden incitar una respuesta inmune.

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

Moléculas co-estimuladoras

Las respuestas inmunes adaptativas requieren dos señales para la activación inicial: una señal proporcionada a través de la unión de péptido-MHC en la célula presentadora de antígeno (APC) al receptor de las células T (TCR), y una segunda señal independiente de antígeno denominada co-estimulación. CD28 es un receptor de membrana en las células T que proporciona función co-estimuladora cuando las células T se encuentran a APC que expresan ligandos CD28, B7-1 (CD80) de B7-2 (CD86). Las funciones de CD28 son predominantemente influir en señales iniciadas a través de TCR, lo que resulta en cambios cualitativos y cuantitativos en la cascada de eventos que dan lugar a la proliferación, producción de citocinas, y supervivencia celular. El desencadenamiento de células T sin estimular sin la señal co-estimuladora puede convertir las células T en funcionalmente no respondedoras (anergia, apoptosis). CD28 induce una mayor proliferación de células T CD4+ comparado con células T CD8+. Otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) CD28 tal como incluye co-estimulador inducible (ICOS) proporciona señales co-estimuladoras en células T CD4+ y CD8+ activadas para aumentar su proliferación.

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

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

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

Citocinas

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

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

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

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

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

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

Para el tratamiento del cáncer, los investigadores están desarrollando vacunas que pueden estimular al sistema inmune para reconocer las células cancerosas. Estas vacunas pueden ayudar al cuerpo a rechazar tumores y prevenir que el cáncer recurra. A diferencia de las vacunas frente a enfermedades infecciosas, las vacunas del cáncer se diseñan para inyectarlas después de que se ha diagnosticado la enfermedad, en lugar de antes de que se desarrolle. Por ejemplo, se ha mostrado que la inmunización con DC cargadas con péptidos apropiados de antígenos asociados con tumores (TAA) estimulan células T "específicas de tumor", que en algunos pacientes previenen la progresión adicional de la enfermedad y eventualmente dan lugar a la regresión de la enfermedad. Esta estrategia se aprovecha de la "ruta profesional" de procesamiento/presentación de antígeno realizada por las DC. Por el contrario, la inyección de TAA tumorales solubles o moléculas MHC solubles que comprenden péptidos apropiados de TAA sólo ha demostrado un efecto limitado o ninguno, debido presumiblemente a la baja eficacia de la estimulación de antígeno por antígenos solubles. La baja afinidad así como la estimulación insuficiente de células T específicas puede explicar la baja protección obtenida por la inmunización con péptido/molécula MHC soluble. De hecho, la baja afinidad intrínseca de las interacciones ligando-receptor esenciales ha implicado una utilización limitada de proteínas recombinantes solubles para la estimulación de células T específicas.

La presente divulgación

Como es evidente a partir de lo anterior, las moléculas MHC juegan un papel muy importante, y así la detección de células que reconocen moléculas MHC tiene una gran importancia y valor. Asimismo, se han hecho varios intentos para manipular el sistema inmune de una manera controlable, eficiente y consistente.

Sin embargo, el éxito ha sido limitado. Así, el descubrimiento de sustancias para inmunoterapia que realmente funcionen sería una etapa principal hacia delante para la lucha frente a varias enfermedades graves para las que actualmente no existe cura.

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

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

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

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

La combinación de las bases de datos de genoma crecientes de secuencias proteicas primarias de seres humanos y parásitos con el conocimiento de cómo el sistema inmune maneja la información molecular proporcionada por ligandos apropiados dará lugar a estrategias nuevas y potentes para el desarrollo de vacunas curativas. Esto, a su vez, mejorará las posibilidades para manipulaciones inmunes dirigidas y eficientes frente a enfermedades causadas por la génesis tumoral o infección por agentes patógenos como virus y bacterias. VIH es un ejemplo importante. La capacidad para

generar y ligar moléculas MHC recombinantes o una diversidad de ligandos mixtos a moléculas vehículo como se considera por la presente divulgación, permitirá una herramienta analítica nueva para monitorizar las respuestas inmunes y contribuir a una plataforma racional para nuevas aplicaciones de terapia y de "vacuna". Las composiciones terapéuticas ("vacunas") que estimulan la proliferación de células T específicas por la estimulación específica de péptido es de hecho una posibilidad en la presente divulgación. Así, el análisis cuantitativo y detección basada en ligando de células T específicas que proliferan por la estimulación específica de péptido debe realizarse simultáneamente a la monitorización de la respuesta generada. Los métodos efectivos para producir una diversidad de moléculas del grupo de proteínas codificadas por HLA humano altamente polimórfica daría lugar a análisis avanzados de respuestas inmunes complejas, que pueden comprender una diversidad de clones de células T específicos de epítipo peptídico. La citometría de flujo basada en alta avidéz y las estrategias de tinción de tejidos de la tecnología del estado de la técnica descritas en el presente documento contribuirán significativamente al desarrollo de dichos análisis avanzados de respuestas de células T.

Las construcciones de moléculas MHC de la presente divulgación

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

"Construcción de moléculas MHC" y "construcciones MHC" pueden usarse indistintamente en el presente documento.

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

Una "molécula MHC Clase I" tal y como se usa en cualquier lugar en el presente documento se define como una molécula que comprende 1-3 subunidades, incluyendo una cadena pesada, una cadena pesada combinada con una cadena ligera (β_2m), una cadena pesada combinada con una cadena ligera (β_2m) mediante un enlazador flexible, una cadena pesada combinada con un péptido, una cadena pesada combinada con un péptido mediante un enlazador

flexible, un dímero cadena pesada/ β_2m combinado con un péptido, y un dímero cadena pesada/ β_2m combinado con un péptido mediante un enlazador flexible a la cadena pesada o ligera. La cadena de molécula MHC puede cambiarse por sustitución de un único aminoácido o cohortes de aminoácidos nativos o por insertos, o delecciones para aumentar o alterar las funciones atribuidas a dicha molécula. Como ejemplo, se ha mostrado que la sustitución de XX con YY en posición nn de β_2m humano aumenta la estabilidad bioquímica de los complejos de moléculas MHC Clase I y así puede dar lugar a una presentación de antígeno más eficiente de epítomos peptídicos subdominantes.

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

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

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

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

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

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

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

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

La definición de la construcción de moléculas MHC de la presente divulgación permite diversas posibilidades valiosas con respecto a las moléculas MHC. De esta manera, los ejemplos de construcciones de moléculas MHC valiosas son tales

en donde al menos dos de las moléculas MHC son diferentes, en donde las moléculas de MHC son iguales, en donde al menos dos de los péptidos albergados por las moléculas MHC son diferentes, en donde los péptidos albergados por las moléculas MHC son iguales, en donde los péptidos albergados por las moléculas MHC están químicamente modificados o sintetizados para contener aminoácidos no naturales, o para contener grupos hidrófilos o hidrófobos, en donde los péptidos albergados por las moléculas MHC Clase I están unidos a la cadena pesada MHC Clase I por un enlazador flexible, en donde los péptidos albergados por las moléculas MHC Clase I están unidos a la cadena ligera (β_2m) MHC Clase I por un enlazador flexible, en donde los péptidos están albergados por moléculas MHC Clase I que comprenden cadena pesada MHC Clase I en asociación con una cadena ligera (β_2m) por un enlazador flexible, en donde el péptido albergado por las moléculas MHC Clase II están unidos a la cadena alfa por un enlazador flexible, en donde el péptido albergado por las moléculas MHC Clase II están unidos a la cadena β por un enlazador flexible, en donde las moléculas MHC Clase I están mutadas, en donde las moléculas MHC Clase II están mutadas.

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

En particular, si los péptidos albergados por una pluralidad de moléculas MHC son diferentes entre sí, esto puede usarse para detectar varios tipos de células que reconocen MHC simultáneamente. Esto puede conseguirse bien empleando una construcción de moléculas MHC con moléculas MHC cargadas con diferentes péptidos, o empleando varias construcciones de moléculas MHC, en donde cada construcción de moléculas MHC tiene moléculas MHC con

el mismo tipo de péptido, por ejemplo, presentando una construcción de moléculas MHC un péptido, y presentando otra construcción de moléculas MHC otro péptido.

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

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

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

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

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

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

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

Como ejemplo, una molécula MHC etiquetada podría ser una molécula MHC de fusión recombinante que consiste en

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

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

Dichas moléculas biológicamente activas pueden seleccionarse en particular de proteínas, moléculas co-estimuladoras, moléculas que modulan la célula, receptores, moléculas auxiliares, moléculas de adhesión, ligandos naturales, y moléculas tóxicas, así como anticuerpos y moléculas de unión recombinantes a cualquiera de los anteriores, y combinaciones de las mismas. "Moléculas de unión recombinantes" se pretende que signifique moléculas tales como fragmento peptídico preparadas por tecnología recombinante, y que tienen la capacidad de mimetizar la actividad (por ejemplo, regulación positiva o regulación negativa) de las moléculas naturales, o de inhibir o bloquear la actividad de las moléculas naturales.

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

En particular, la molécula biológicamente activa puede seleccionarse de proteínas tales como proteínas semejantes a MHC Clase I como MIC A, MIC B, CD1d, HLA E, HLA F, HLA G, HLA H, ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3,

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

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

moléculas auxiliares tales como LFA-1, CD11a/18, CD54 (ICAM-1), CD106 (VCAM), y CD49a,b,c,d,e,f/CD29 (VLA-4), moléculas de adhesión tales como ICAM-1, ICAM-2, GlyCAM-1, CD34, anti-LFA-1, anti-CD44, anti-beta7, quimiocinas, CXCR4, CCR5, anti-selectina L, anti-selectina E, y anti-selectina P,

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

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

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

En particular,

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

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

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

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

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

En algunas aplicaciones, puede ser ventajoso aplicar diferentes construcciones de moléculas MHC, bien como una combinación o en etapas individuales. Dichas diferentes construcciones de moléculas MHC pueden marcarse de forma

diferente (es decir, marcando con diferentes compuestos marcadores) lo que permite la visualización de diferentes células que reconocen MHC diana. Así, si están presentes varias construcciones de moléculas MHC diferentes con diferentes compuestos marcadores, es posible identificar simultáneamente más de un receptor específico, si cada una de las construcciones de moléculas MHC presenta un péptido diferente.

El compuesto marcador es preferentemente uno que es directa o indirectamente detectable.

El compuesto marcador puede ser cualquier compuesto marcador adecuado para detección directamente o indirectamente. Por el término, "directamente" se quiere decir que el compuesto marcador puede detectarse en sí mismo sin la necesidad de un compuesto secundario, es decir, es un compuesto marcador "primario". Por el término "indirectamente" se quiere decir que el compuesto marcador puede detectarse usando uno o más compuestos "secundarios", es decir, la detección se realiza por la detección de la unión del compuesto o compuestos secundarios al compuesto primario.

El compuesto marcador puede unirse adicionalmente mediante un enlazador adecuado. Los enlazadores adecuados para la unión a compuestos marcadores serán fácilmente conocidos por el experto en la materia.

Los ejemplos de dichos compuestos marcadores adecuados son marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, radioisótopos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, polímeros, partículas metálicas, haptenos, anticuerpos y agentes de tinción.

El compuesto marcador puede seleccionarse adecuadamente de marcadores fluorescentes tales como 5- (y 6)-carboxifluoresceína, 5- o 6-carboxifluoresceína, ácido 6-(fluoresceín)-5-(y 6)-carboxamido hexanoico, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, tetrametilrodamina, y agentes de tinción tales como Cy2, Cy3, y Cy5, cumarina sustituida opcionalmente incluyendo AMCA, PerCP, ficobiliproteínas incluyendo R-ficoeritrina (RPE) y aloficoeritrina (APC), Rojo Texas, Rojo Princeton, proteína verde fluorescente (GFP) y análogos de ésta, y conjugados de R-ficoeritrina y aloficoeritrina y, por ejemplo, Cy5 o Rojo Texas, y marcadores fluorescentes inorgánicos basados en nanocristales semiconductores (como nanocristales quantum dot y Qdot™), y marcadores fluorescentes de tiempo resuelto basados en lantánidos como Eu3+ y Sm3+, de haptenos tales como DNP, biotina, y digoxigenina, de marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (GAL), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, beta-N-acetil-glucosaminidasa, β-glucuronidasa, invertasa, Xantina Oxidasa, luciferasa de luciérnaga y glucosa oxidasa (GO), de marcadores luminiscentes tales como luminol, isoluminol, ésteres de acridinio, 1,2-dioxetanos y piridopiridazinas, y de marcadores radiactivos tales como isótopos incorporados de yodo, cobalto, selenio, tritio y fósforo.

Los marcadores radiactivos pueden ser interesantes en particular en conexión con el marcaje de los péptidos albergados por las moléculas MHC.

Como se ha definido anteriormente, las construcciones de moléculas MHC de la divulgación comprenden una molécula vehículo. La molécula vehículo puede ser una molécula vehículo soluble o una molécula vehículo no soluble. La molécula vehículo puede ser cualquiera tal que permita la unión de las moléculas MHC, las entidades de unión, y/o los compuestos biológicamente activos, mientras proporciona las propiedades ventajosas de la construcción. Los ejemplos de moléculas vehículo adecuadas son polisacáridos incluyendo dextranos, carboxi metil dextrano, dextrano polialdehído, carboximetil dextran lactona, y ciclodextrinas, pululanos, esquizofilano, escleroglucano, xantano, gellan, O-etilamino guaran, quitinas y quitosanos incluyendo 6-O-carboximetil quitina y N-carboximetil quitosán, celulósicos derivatizados incluyendo carboximetil celulosa, carboximetil hidroxietil celulosa, hidroxietil celulosa, 6-amino-6-desoxi celulosa y O-etil-amina celulosa, almidón hidroxilado, hidroxipropil almidón, hidroxietil almidón, carragenanos, alginatos, y agarosa, polisacáridos sintéticos incluyendo ficol y ficol carboximetilado, polímeros de vinilo incluyendo poli(ácido acrílico), poli(acrilamidas), poli(ésteres acrílicos), poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido maleico), poli(anhídrido maleico), poli(acrilamida), poli(etil-co-vinil acetato), poli(ácido metacrílico), poli(vinil alcohol), poli(vinil alcohol-co-vinil cloroacetato), poli(vinil alcohol) aminado, y polímeros co bloque de éstos, poli etilen glicol (PEG) o polipropilen glicol o poli(óxido de etileno-co-óxidos de propileno) que contienen núcleos poliméricos incluyendo dendrímeros lineales, en forma de peine o StarBurst™, poliaminoácidos incluyendo polilisinas, ácido poliglutámico, poliuretanos, poli(etilen iminas), pluriol, proteínas incluyendo albúminas, inmunoglobulinas, y proteínas semejantes a virus (VLP), y polinucleótidos, ADN, PNA, LNA, oligonucleótidos y construcciones de dendrímeros de oligonucleótidos.

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

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

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

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

Los ejemplos de disolventes adecuados son agua y diversos tampones tales como acetato, sulfato de amonio, cloruro de sodio, CAPS, CHES, imidazol, PIPES, TAPS, TES, trietanolamina, MOPS, MES, HEPES, PBS, carbonato, TRIS, tampones que contienen borato, así como mezclas de los mismos. Otros disolventes adecuados incluyen mezclas acuosas que contienen etilenglicol, propilenglicol, NMP, DMSO, o DMF.

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

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

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

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

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

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

También pueden ser aplicables las perlas poliméricas no magnéticas. Tales están disponibles de un amplio intervalo de fabricantes, por ejemplo, Dynal Particles AS, Qiagen, Amersham Biosciences, Serotec, Seradyne, Merck, Nippon Paint, Chemagen, Promega, Prolabo, Polysciences, Agowa, y Bangs Laboratories.

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

El soporte puede tener adecuadamente una superficie funcionalizada. Los diferentes tipos de funcionalización incluyen hacer que la superficie del soporte esté cargada positiva o negativamente, o hidrófila o hidrófoba. Esto se aplica en particular a perlas y partículas. Diversos métodos se describen, por lo tanto, por ejemplo, en el documento US 4.336.173 (ref. 25), el documento US 4.459.378 (ref. 27) y el documento US 4.654.267 (ref. 28).

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

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

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

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

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

Así, la presente divulgación se refiere en particular a construcciones de moléculas MHC como se han definido anteriormente para uso en métodos de citometría de flujo, métodos histoquímicos, y métodos citoquímicos. De acuerdo con esto, las construcciones de moléculas MHC de la divulgación son adecuadas como sistemas de detección.

Métodos que emplean las construcciones de moléculas MHC de la divulgación

Las construcciones de moléculas MHC de la divulgación son una herramienta poderosa en un amplio intervalo de métodos *in vitro* o *ex vivo*.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dichos métodos son una herramienta valiosa de diversas maneras. Los métodos pueden usarse para determinar si un tratamiento está combatiendo eficazmente la enfermedad. El método también puede proporcionar información acerca de células aberrantes, que surgen a través del progreso de la enfermedad o afección así como de si se afecta y cómo la especificidad de las células T, proporcionando de esta manera información de la eficacia de un medicamento en cuestión. La unión de la construcción de moléculas MHC hace posible estas opciones, ya que la unión es indicativa de la presencia de las células que reconocen MHC en la muestra, y de acuerdo con esto la presencia de moléculas MHC que presentan el péptido.

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

- (a) proporcionar una muestra que comprende células que reconocen MHC,
- (b) poner en contacto la muestra con una construcción de moléculas MHC inmovilizada en un soporte sólido como se ha definido anteriormente,
- (c) aislar las células que reconocen MHC relevantes, y

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

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

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

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

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

Por ejemplo, dichas células que reconocen MHC pueden estar implicadas en enfermedades de origen inflamatorio, autoinmune, alérgico, vírico, canceroso, infeccioso, alo o xenogénico (injerto frente a hospedador y hospedador frente a injerto).

En particular, las células que reconocen MHC pueden estar implicadas en una enfermedad inflamatoria crónica del intestino tales como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, esclerosis, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis atópica, asma, melanoma maligno, carcinoma renal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer del útero, cáncer cervical, cáncer prostático, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, linfoma cutáneo, carcinoma hepático, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, enfermedad relacionada con el rechazo, enfermedad relacionada con injerto frente a hospedador, o una enfermedad vírica asociada a hepatitis, SIDA, sarampión, viruela, varicela, rubeola o herpes.

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

En los métodos descritos anteriormente, la muestra se selecciona preferentemente de material histológico, material citológico, tumores primarios, metástasis orgánicas secundarias, aspirados con aguja fina, tejido del bazo, muestras de médula ósea, extensiones celulares, muestras citológicas exfoliativas, preparaciones por impronta, frotis orales, frotis laríngeos, frotis vaginales, lavado bronquial, lavado gástrico, del cordón umbilical, y de fluidos corporales tales como sangre (por ejemplo, de una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de la sangre o de otras preparaciones derivadas de la sangre tales como productos de leucoféresis), de muestras de esputo, expectorados, y aspirados bronquiales. Dichas muestras pueden usarse tal cual, o pueden someterse a varios métodos de purificación, descontaminación, filtración, o concentración, y/o métodos para aislar partes de la muestra como separación inmunomagnética. La muestra o parte de la misma (constituyentes de la muestra) puede tratarse además de manera que se preserve la morfología o se pare a las células de la muestra. Dichos métodos para el tratamiento de las muestras son fácilmente conocidos por el experto en la materia. La frase "células de la muestra" tal y como se usa en cualquier lugar en el presente documento se pretende que signifique la muestra como tal o partes aisladas de la misma, se apliquen o no varios tratamientos.

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

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

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

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

Métodos citológicos e histológicos

Los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse como métodos citológicos e histológicos (métodos con muestra montada).

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

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

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

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

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

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

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

Los métodos *in vitro* deben entenderse como métodos, en donde no se preserva la morfología global. En el caso de métodos *in vitro*, la muestra se somete a un tratamiento, que irrumpe la morfología de la estructura celular. Dichos tratamientos son conocidos para el experto en la materia e incluyen tratamiento con disolventes orgánicos, tratamiento con reactivos caotrópicos fuertes tales como altas concentraciones de tiocianato de guanidina, tratamiento enzimático, tratamiento con detergente, molienda de perlas, tratamiento con calor, sometimiento a ultrasonidos y/o aplicación de una prensa francesa.

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

Un procedimiento de citología muy conocido es el procedimiento médico del ensayo Papanicolaou usado para detectar

cáncer del cuello uterino. Se toma un raspado, cepillado, o frotis, de la superficie de la vagina o cuello uterino y se prepara en un portaobjetos y se tiñe para examen microscópico y análisis citológico. La apariencia de las células determina si son normales, sospechosas, o cancerosas.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La tinción enzimática usa marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (GAL), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, beta-N-acetil-glucosaminidasa, invertasa, Xantina

Oxidasa, luciferasa de luciérnaga y glucosa oxidasa (GO).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Método de citometría de flujo

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

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

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

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

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

Los láseres se usan como la fuente de luz preferida en los citómetros de flujo modernos. El láser usado más comúnmente es el láser de ion argón. Éste produce una línea principal a 488 nm, que proporciona una fuente de luz

azul para excitación, por ejemplo, de fluoresceína, ficoeritrina, conjugados en tándem y para yoduro de propio usado en las mediciones de ADN. En la celda de flujo, las células se alinean mediante focalización hidrodinámica, de manera que pasan a través de los haces de láser una cada vez.

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

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

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

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

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

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

Las poblaciones de células o partículas pueden representarse en histogramas de un único parámetro o parámetro dual. Las señales de dispersión de la luz y fluorescencia pueden analizarse después de la amplificación lineal o logarítmica. Una vez se ha identificado la población de células o partículas que se va a analizar, se determina la fluorescencia asociada con anticuerpos o agentes de tinción unidos después de haber establecido la fluorescencia de fondo.
40

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

El campo eléctrico creado entre las placas puede dirigir a las células o partículas hacia uno de varios receptáculos de recogida especificados por el usuario. Las gotitas no cargadas fluyen a un recipiente de desecho.
50

El análisis de las concentraciones de células o subconjuntos de células, a menudo denominado "recuento absoluto", puede ser además interesante para el diagnóstico médico o para monitorizar el estado de células en cultivos celulares u otros procesos biotecnológicos.
55

El citómetro de flujo es capaz de cribar rápidamente grandes números de células mucho más allá de la capacidad de los métodos patológicos o citológicos tradicionales. La información obtenida ayuda en el diagnóstico, clasificación, y pronóstico de una diversidad de enfermedades.
60

Las aplicaciones en donde puede aplicarse la citometría de flujo se han extendido rápidamente desde la separación de células, hasta la medida de antígenos de la superficie celular, y análisis de ADN para ayudar en la interpretación de trastornos neoplásicos.
65

Los usos comunes para la citometría de flujo en el laboratorio clínico rutinario incluyen inmunofenotipado de

neoplasmas hematopoyéticos, evaluación del estado inmune, especialmente cuantificación de células T CD4+ en pacientes positivos para VIH, y análisis del ADN en el ciclo celular de tumores sólidos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Otras técnicas

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

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

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

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

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

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

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

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

Composiciones que comprenden construcciones de moléculas MHC

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

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

45 Así, la presente divulgación se refiere a composiciones que comprenden una construcción de moléculas MHC como se ha definido anteriormente, y opcionalmente otros componentes tales como tampones y/o medios de visualización. Las moléculas MHC de la construcción de moléculas MHC puede ser moléculas MHC cargadas con péptido o sin péptido como se ha definido anteriormente, o una mezcla de las mismas. La construcción de moléculas MHC y opcionalmente otros componentes puede proporcionarse en recipientes separados o en el mismo recipiente.

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

55 En una realización, la composición de la presente divulgación comprende una construcción de moléculas MHC como se ha definido anteriormente en un medio de solubilización. La composición puede ser tal, en donde la construcción de moléculas MHC comprende moléculas MHC cargadas con péptido, o tal, en donde la construcción de moléculas MHC comprende moléculas MHC sin péptido. En el último caso, la composición puede ser tal, en donde los péptidos que cargan las moléculas MHC sin péptido y la construcción de moléculas MHC que comprenden moléculas MHC sin péptido se proporcionan separadamente.

60 En otra realización, la composición de la presente divulgación comprende una construcción de moléculas MHC como se ha definido anteriormente, en donde la construcción de moléculas MHC se inmoviliza en un soporte sólido o semi-sólido. Los soportes sólidos y semi-sólidos adecuados se indican anteriormente. La composición puede ser tal, en donde la construcción de moléculas MHC comprende moléculas MHC cargadas con péptido, o tal, en donde la construcción de moléculas MHC comprende moléculas MHC sin péptido. En el último caso, la composición puede ser tal, en donde los péptidos para cargar las moléculas MHC sin péptido se proporcionan separadamente.

65

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

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

Producción de moléculas MHC, péptidos y construcciones de moléculas MHC

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

Producción de la molécula MHC

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

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

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

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

Las moléculas MHC pueden obtenerse clonando ADNc que codifica las diferentes moléculas de interés según procedimientos convencionales, por ejemplo, como se describe en Molecular Cloning (Sambrook, Fritsch y Maniatis, Cold Spring Harbor Press, 1989, ref. 13). Brevemente, se sintetiza ADNc a partir de líneas celulares apropiadas usando kits de síntesis de ADNc comerciales (*in casu* de Pharmacia). Por ejemplo, en el caso de células humanas, las células pueden derivar del panel de líneas de células B humanas transformadas con EBV que expresan HLA de la Base de Datos de Panel de Líneas Celulares del 12 International Histocompatibility Workshop ("HLA: Genetic diversity of HLA.

Functional and Medical Implication", Ed. Dominique Charron, EDK Press, 1997 (ref. 12). Por ejemplo, en el caso de HLA A*0201, una línea celular apropiada sería IHW 9012. La secuencia de nucleótidos correspondiente a una molécula MHC (HLA) deseada puede encontrarse en bases de datos disponibles públicamente. Usando la información de secuencia apropiada, pueden diseñarse cebadores oligonucleotídicos para amplificar por la reacción PCR la región codificadora que engloba la molécula MHC (HLA) madura relevante a partir del ADNc apropiado. El conjunto de cebadores directo e inverso relevante para el propósito de amplificar se inserta en los sitios de restricción NcoI y HindIII de un vector de expresión apropiado. Los vectores de expresión adecuados se pueden obtener, por ejemplo, de Novagen (Novagen, Inc, Madison, WI, EEUU).

Péptidos asociados a moléculas MHC Clase I y MHC Clase II

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Producción de construcciones de moléculas MHC de la divulgación

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

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

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

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

El proceso de la divulgación comprende las etapas de

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

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

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

Más específicamente, el proceso de la presente divulgación comprende las etapas de

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

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

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

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

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

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

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

Las células hospedadoras que comprenden plásmidos de expresión que codifican las moléculas MHC pueden ser de

origen procariota (bacterias) o de origen eucariota (células de levadura, de insecto o de mamífero).

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

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

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

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

Terapia

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

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

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

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

activas, que pueden ser iguales o diferentes. Estas expresiones se describen en lo anterior.

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

Así, la presente divulgación se refiere generalmente a las construcciones de moléculas MHC en sí mismo como se ha definido anteriormente para uso como composiciones terapéuticas o medicamentos. La presente divulgación también se refiere a las construcciones de moléculas MHC como se define en el presente documento para uso en terapia *in vivo* y para uso en terapia *ex vivo*.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a composiciones terapéuticas que comprenden como un principio activo una construcción de moléculas MHC como se define en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a composiciones terapéuticas que comprenden como principio activo una cantidad efectiva de células que reconocen MHC, pudiendo obtenerse las células que reconocen MHC poniendo en contacto de una muestra de un sujeto que comprende células que reconocen MHC con una construcción de moléculas MHC como se describe en el presente documento, mediante lo cual las células que reconocen MHC se unen a la construcción de moléculas MHC, el aislamiento de la construcción de moléculas MHC y las células que reconocen MHC unidas, y la expansión de dichas células que reconocen MHC hasta un número clínicamente relevante.

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

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

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

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

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

Más específicamente, la enfermedad puede ser de origen inflamatorio/autoinmune, incluyendo asma, neumonitis por hipersensibilidad, enfermedad pulmonar intersticial, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar intersticial asociada con enfermedad de

- Crohn o colitis ulcerosa o enfermedad de Whipple, enfermedad pulmonar intersticial asociada con granulomatosis de Wegeners o vasculitis por hipersensibilidad, síndromes de vasculitis, púrpura de Hennoch-Schönleins, síndrome de Goodpastures, granulomatosis de Wegeners, enfermedades renales tales como glomerulopatía mediada por anticuerpos como en glomerulonefritis aguda, nefritis asociada con lupus eritematoso sistémico, nefritis asociada con otras enfermedades sistémicas tales como granulomatosis de Wegeners y síndrome de Goodpastures y enfermedad mixta del tejido conectivo, nefritis intersticial crónica, glomerulonefritis crónica, enfermedades gastrointestinales tales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, enfermedad de Whipple, colitis colagenosa, colitis eosinofílica, colitis linfática,
- 10 enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis autoinmune, hepatitis inducida por el alcohol, fibrosis periportal, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, enfermedades del sistema nervioso central o periférico tales como enfermedad desmielinizante como esclerosis múltiple, encefalomiелitis diseminada aguda, panencefalitis esclerosante sub-aguda, enfermedad de la piel tal como psoriasis, dermatitis atópica, eccema, enfermedad alérgica de la piel, esclerosis sistémica progresiva (escleroderma), dermatitis exfoliante, pénfigo vulgar,
- 15 enfermedades de las articulaciones tales como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis asociada con psoriasis o enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedades músculo-esqueléticas tales como miastenia grave, polimiositis, enfermedades endocrinas tales como diabetes mellitus dependiente de insulina, tiroiditis autoinmune (Hashimoto), tirototoxicosis, Graves,
- 20 enfermedades del sistema hematopoyético tales como anemia autoinmune, trombocitopenia autoinmune, enfermedades cardiovasculares tales como cardiomiopatía, vasculitis, enfermedad cardiovascular asociada con enfermedades sistémicas como lupus eritematoso sistémico, poliartritis nodosa, artritis reumatoide, escleroderma, sarcoidosis,
- 25 enfermedades de origen canceroso, incluyendo melanoma maligno, síndrome de Sezary, linfoma de células T cutáneo, carcinoma de células renales, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer del útero, cáncer prostático, carcinoma hepático, cáncer de pulmón, y sarcoma, enfermedades, trastornos o afecciones de origen alérgico.
- 30 Los alérgenos más comunes, frente a los que se producen reacciones alérgicas, incluyen inhalación de alérgenos que se originan entre otros de árboles, gramas, hierbas, hongos, ácaros domésticos, ácaros de almacenamiento, cucarachas y pelo animal, plumas, y caspa. Los alérgenos de polen importantes de árboles, gramas y hierbas son los que se originan de los órdenes taxonómicos de *Fagales*, *Oleales* y *Pinales* incluyendo entre otros abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), el orden de *Poales* incluyendo entre otros gramas de los géneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis* y *Secale*, los órdenes de *Asterales* y *Urticales* incluyendo entre otros hierbas de los géneros *Ambrosia* y *Artemisia*. Los alérgenos de inhalación importantes de hongos son entre otros los que se originan de los géneros *Alternaria* y *Cladosporium*. Otros alérgenos de inhalación importantes son los de ácaros domésticos del género *Dermatophagoides*, ácaros de almacenamiento del género *Lepidoglyphys destructor*, los de cucarachas y los de mamíferos tales como gato, perro, caballo, vaca, y pájaro. También, se observan comúnmente reacciones alérgicas frente a insectos picadores o chupadores tales como los del orden taxonómico de Hymenoptera incluyendo abejas, avispas, y hormigas. Los componentes alérgenos específicos son conocidos por el experto en la materia e incluyen *Bet v 1* (*B. verrucosa*, abedul), *Aln g 1* (*Alnus glutinosa*, aliso), *Cor a 1* (*Corylus avellana*, avellano) y *Car b 1* (*Carpinus betulus*, carpe) del orden *Fagales*. Otros son *Cry j 1* (*Pinales*), *Amb a 1 y 2*, *Art v 1* (*Asferales*), *Par j 1* (*Urticales*), *Ole a 1* (*Oleales*), *Ave a 1*, *Cyn d 1*, *Dac g 1*, *Fes p 1*, *Hol l 1*, *Lol p 1 y 5*, *Pas n 1*, *Phl p 1 y 5*, *Poa p 1, 2 y 5*, *Sec c 1 y 5*, y *Sor h 1* (varios pólenes de grama), *Alt a 1 y Cla h 1* (hongos), *Der f 1 y 2*, *Der p 1 y 2* (ácaros domésticos, *D. farinae* y *D. pteronyssinus*, respectivamente), *Lep d 1*, *Bla g 1 y 2*, *Per a 1* (cucarachas, *Blatella germanica* y *Periplaneta americana*, respectivamente), *Fel d 1* (gato), *Can f 1* (perro), *Equ c 1, 2 y 3* (caballo), *Apis m 1 y 2* (abeja de la miel), *Ves g 1, 2 y 5*, *Pol a 1, 2 y 5* (todas las avispas) y *Sol i 1, 2, 3 y 4* (hormiga de fuego), por mencionar los más comunes.
- 50 Las composiciones terapéuticas de la divulgación pueden formularse de cualquier manera adecuada, entre otros dependiendo de la ruta de administración, y la cantidad de principio activo que se va a administrar. En particular, las composiciones terapéuticas de la divulgación pueden formularse para administración parenteral, incluyendo administración intravenosa, intramuscular, intraarticular, subcutánea, intradérmica, epicutánea/transdérmica, e intraperitoneal, para infusión, para administración oral, para administración nasal, para administración rectal, o para administración tópica.
- 55 La construcción de moléculas MHC puede inmovilizarse adecuadamente en un soporte sólido o semi-sólido. Los ejemplos de soporte sólido o semi-sólido son aquellos mencionados anteriormente, es decir, partículas, perlas, partículas biodegradables, láminas, geles, filtros, membranas, fibras, capilares, agujas, tiras de microtitulación, tubos, placas o pocillos, peines, puntas de pipeta, micromatrices, y chips. En particular, el soporte sólido puede seleccionarse de partículas y perlas, preferentemente partículas y perlas, que son poliméricas, magnéticas o superparamagnéticas. Para terapia *in vivo*, se preferirán especialmente las partículas biodegradables, mientras que para terapia *ex vivo*, se preferirán especialmente las partículas biodegradables, poliméricas, magnéticas, paramagnéticas o superparamagnéticas.
- 60
- 65

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

- 5 Las construcciones de moléculas MHC poli-ligando, debido a la molécula vehículo, pueden cargarse con una pluralidad de moléculas MHC que presentan péptido para asegurar una unión de alta afección a contra receptores específicos.

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

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

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

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

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

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

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

55 Se ha empleado una diversidad de diferentes estrategias de la técnica anterior en un intento para restaurar o aumentar la respuesta inmune del paciente a tumores, incluyendo el tratamiento con anticuerpos monoclonales, vacunas de cáncer, terapia con citocinas e inmunoterapia celular adoptiva usando células dendríticas o células T. La inmunoterapia celular que implica células T incluye células efectoras citotóxicas CD8+ que tienen la capacidad de matar células tumorales. Además, se ha mostrado que las células T productoras de citocinas CD4+ también juegan un papel importante en el mantenimiento de una actividad celular anti-tumoral sostenible de las células CD8 citotóxicas. Sin embargo, el éxito de los métodos de la técnica anterior ha sido limitado.

60 Según lo anterior, las construcciones de moléculas MHC interesantes de la composición terapéutica pueden ser aquellas,

en donde al menos dos de las moléculas MHC de la construcción de moléculas MHC usada son diferentes,
 en donde las moléculas MHC de la construcción de moléculas MHC usada son iguales,
 en donde al menos dos de los péptidos albergados por una pluralidad de moléculas MHC de la construcción de moléculas MHC usada son diferentes,
 5 en donde los péptidos albergados por las moléculas MHC de la construcción de moléculas MHC usada son iguales,
 en donde los péptidos albergados por las moléculas MHC de la construcción de moléculas MHC usada se modifican químicamente o se sintetizan para contener aminoácidos no naturales, grupos hidrófilos o hidrófobos,
 en donde los péptidos albergados por las moléculas MHC Clase I de la construcción de moléculas MHC usada están unidos a la cadena pesada MHC Clase I por un enlazador flexible,
 10 en donde los péptidos albergados por las moléculas MHC Clase I de la construcción de moléculas MHC usada están unidos a la cadena ligera MHC Clase I (β_2m) por un enlazador flexible,
 en donde los péptidos están albergados por moléculas MHC Clase I de la construcción de moléculas MHC usada que comprenden cadena pesada MHC Clase I en asociación con una cadena ligera MHC (β_2m) por un enlazador flexible,
 en donde el péptido albergado por las moléculas MHC Clase II de la construcción de moléculas MHC usada está unido
 15 a la cadena alfa por un enlazador flexible,
 en donde el péptido albergado por las moléculas MHC Clase II de la construcción de moléculas MHC usada está unido a la cadena β por un enlazador flexible,
 en donde las moléculas MHC Clase I de la construcción de moléculas MHC usada están mutadas,
 en donde las moléculas MHC Clase II de la construcción de moléculas MHC usada están mutadas,
 20 en donde las moléculas MHC de la construcción de moléculas MHC usada son moléculas MHC que carecen de péptido.

Como se ha mencionado anteriormente, la construcción de moléculas MHC puede comprender una o más moléculas biológicamente activas. Éstas se han definido anteriormente. Los compuestos biológicamente activos particularmente
 25 preferidos se seleccionarán de MIC A, MIC B, CD1d, ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD9, CD27, CD28, CD30, CD69, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD147, CDw150 (SLAMF), CD152 (CTLA-4), CD153 (CD30L), CD40L (CD154), NKG2D, ICOS, HVEM, HLA Clase II, PD-1, Fas (CD95), FasL, CD40, CD48, CD58, CD70, CD72, B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), B7RP-1, B7-H3, PD-L1, PD-L2, CD134L, CD137L, ICOSL, LIGHT, CD16, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80, 2B4, KIR, LIR, CD94/NKG2A y CD94/NKG2C.

Como se ha mencionado, la presente divulgación se refiere a métodos para el tratamiento de un animal, incluyendo un ser humano, cuyos métodos comprenden administrar una composición terapéutica como se describe en el presente documento en una cantidad eficaz. El tratamiento puede ser tal que implique la regulación positiva, regulación negativa, modulación, estimulación, inhibición, restauración, aumento y/o de otra manera manipulación de las
 35 respuestas inmunes. Esto puede conseguirse de hecho por las composiciones de la presente divulgación. La presente divulgación también se refiere a métodos para inducir anergia en una célula, métodos mediante los cuales se administra una composición terapéutica como se describe en el presente documento.

En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a métodos para llevar a cabo inmunoterapia adoptiva, métodos que comprenden administrar a un animal, incluyendo un ser humano, una composición terapéutica como se describe en el presente documento.

Terapia *in vivo*

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

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

La administración de la composición de la divulgación puede ser como dosis únicas o como varias dosis. En determinados casos, la administración sólo una vez puede ser suficiente. En general, deben proporcionarse varias dosis con intervalos de un día, una semana, dos semanas, un mes, o varios meses, etc. Por ejemplo, una dosis única puede proporcionarse una vez, o una dosis puede proporcionarse como un cebador, seguido de una o más administraciones, o un régimen de administración continua como hasta cuatro dosis por semana, seguido de un mes
 65 sin administraciones, seguido de hasta cuatro dosis por semana (opcionalmente con cantidad creciente de la construcción de moléculas MHC), etc. Opcionalmente pueden usarse diferentes adyuvantes o combinaciones de

adyuvantes en las diferentes administraciones. Éstos son todos ejemplos, y el régimen de administración óptimo depende de la construcción de moléculas MHC en cuestión y de varios otros factores. El experto en la materia sabrá fácilmente cómo optimizar esto.

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

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

15 Los recipientes para mezclar y almacenar la composición terapéutica de la divulgación pueden estar hechos de vidrio o de diversos materiales poliméricos. Los recipientes elegidos no deben adsorber el producto almacenado. Los recipientes pueden ser adecuadamente ampollas o viales tapados para mono o multidosisación.

20 La divulgación se refiere además a métodos para producir las composiciones terapéuticas de la divulgación, cuyos métodos comprenden proporcionar una construcción de moléculas MHC como se describe en el presente documento, y solubilizar o dispersar la construcción de moléculas MHC en un medio adecuado para sustancias terapéuticas, y opcionalmente añadir otros adyuvantes y/o excipientes.

25 Terapia ex vivo

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

30 Así, la presente divulgación se refiere en particular a composiciones terapéuticas que comprenden como un principio activo una cantidad efectiva de células que reconocen MHC, obteniéndose las células que reconocen MHC por aislamiento de un sujeto de células que reconocen MHC usando una construcción de moléculas MHC como se define en el presente documento, y expansión de dichas células que reconocen MHC hasta un número clínicamente relevante.

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

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

En particular:

45 1) Una o más construcciones de moléculas MHC como se define en el presente documento pueden ponerse en contacto con una muestra de un sujeto, mediante lo cual se permite que las construcciones de moléculas MHC se unan a las células que reconocen MHC en la muestra. Las construcciones de moléculas MHC pueden recuperarse de la muestra, posteriormente a esto las células que reconocen MHC pueden liberarse de las construcciones de moléculas MHC y posteriormente expandirse.

50 2) Una o más construcciones de moléculas MHC como se define en el presente documento pueden ponerse en contacto con una muestra de un sujeto, mediante lo cual se permite que las construcciones de moléculas MHC se unan a las células que reconocen MHC en la muestra. Las construcciones de moléculas MHC pueden recuperarse de la muestra, posteriormente a esto las células que reconocen MHC pueden liberarse de la construcción de moléculas MHC y posteriormente expandirse en presencia de una o más otras construcciones de moléculas MHC.

55 3) Una o más construcciones de moléculas MHC como se define en el presente documento inmovilizadas en un soporte sólido o semi-sólido como se define en el presente documento pueden ponerse en contacto con una muestra de un sujeto, mediante lo cual se permite que las construcciones de moléculas MHC se unan a las células que reconocen MHC en la muestra. Las construcciones de moléculas MHC pueden recuperarse de la muestra, posteriormente a esto las células que reconocen MHC pueden liberarse de las construcciones de moléculas MHC y posteriormente expandirse.

60 4) Una o más construcciones de moléculas MHC como se define en el presente documento inmovilizadas en un soporte sólido o semi-sólido como se define en el presente documento pueden ponerse en contacto con una muestra de un sujeto, mediante lo cual se permite que las construcciones de moléculas MHC se unan a las células que reconocen MHC en la muestra. Las construcciones de moléculas MHC pueden recuperarse de la muestra,

posteriormente a esto las células que reconocen MHC pueden liberarse de las construcciones de moléculas MHC y posteriormente expandirse en presencia de una o más otras construcciones de moléculas MHC.

5) Una o más construcciones de moléculas MHC marcadas como se define en el presente documento inmovilizadas en un soporte sólido o semi-sólido como se define en el presente documento pueden ponerse en contacto con una muestra de un sujeto, mediante lo cual se permite que las construcciones de moléculas MHC se unan a las células que reconocen MHC en la muestra. Las construcciones de moléculas MHC pueden recuperarse de la muestra, posteriormente a esto las células que reconocen MHC pueden liberarse de las construcciones de moléculas MHC y posteriormente expandirse.

6) Una o más construcciones de moléculas MHC marcadas como se define en el presente documento inmovilizadas en un soporte sólido o semi-sólido como se define en el presente documento pueden ponerse en contacto con una muestra de un sujeto, mediante lo cual se permite que las construcciones de moléculas MHC se unan a las células que reconocen MHC en la muestra. Las construcciones de moléculas MHC pueden recuperarse de la muestra, posteriormente a esto las células que reconocen MHC pueden liberarse de las construcciones de moléculas MHC y posteriormente expandirse en presencia de una o más otras construcciones de moléculas MHC.

7) Una o más construcciones de moléculas MHC como se define en el presente documento pueden ponerse en contacto con una muestra de un sujeto, mediante lo cual se permite que las construcciones de moléculas MHC se unan a las células que reconocen MHC en la muestra. Después, la muestra que contiene las construcciones de moléculas MHC unidas a las células que reconocen MHC pueden ponerse en contacto con un soporte sólido o semi-sólido como se define en el presente documento que tiene inmovilizado en él una o más moléculas que son capaces de unirse a cualquier parte de las células que reconocen MHC o construcción de moléculas MHC, mediante lo cual la construcción de moléculas MHC con las células que reconocen MHC unidas se unirá al soporte. Las construcciones de moléculas MHC así unidas con las células que reconocen MHC pueden recuperarse de la muestra, posteriormente a esto las células que reconocen MHC pueden liberarse de las construcciones de moléculas MHC y posteriormente expandirse.

8) Una o más construcciones de moléculas MHC marcadas como se define en el presente documento pueden ponerse en contacto con una muestra de un sujeto, mediante lo cual se permite que las construcciones de moléculas MHC se unan a las células que reconocen MHC en la muestra. Después, la muestra que contiene las construcciones de moléculas MHC unidas a las células que reconocen MHC pueden ponerse en contacto con un soporte sólido o semi-sólido como se define en el presente documento que tiene inmovilizado en él una o más moléculas que son capaces de unirse a cualquier parte de las células que reconocen MHC o construcción de moléculas MHC, mediante lo cual la construcción de moléculas MHC con las células que reconocen MHC unidas se unirá al soporte. Las construcciones de moléculas MHC así unidas con las células que reconocen MHC pueden recuperarse de la muestra, posteriormente a esto las células que reconocen MHC pueden liberarse de las construcciones de moléculas MHC y posteriormente expandirse en presencia de una o más otras construcciones de moléculas MHC.

La lista anterior no es exhaustiva de ninguna manera.

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

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

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

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

propósito son el equipo Isolex® 300i o MaxSep® de Baxter Healthcare Corp, o el CliniMACS de Miltenyi Biotech.

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

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

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

Debe entenderse que la expansión de las células puede realizarse adicionalmente en presencia de compuestos adicionales, por ejemplo, los que promueven o estimulan la expansión de las células, inhiben el crecimiento de células no relevantes, o seleccionan las células deseadas. Éstos pueden ser, por ejemplo, una o más moléculas biológicamente activas como se ha descrito anteriormente. Dichos compuestos adicionales también pueden seleccionarse de citocinas tales como linfocinas, interferones, interleucinas, factores de crecimiento y factores estimuladores de colonias. Por ejemplo, puede añadirse IL-2 para aumentar la proliferación de las células, y pueden añadirse otras citocinas para inducir patrones de diferenciación particulares., si se requiere. Por ejemplo, IL-4 desencadena la diferenciación de poblaciones de células T en la subpoblación Th2, e IFN-gamma desencadena la diferenciación en la subpoblación Th1. Por supuesto, tiene que usarse un medio de cultivo adecuado y condiciones adecuadas para expandir y mantener las células. El tiempo de expansión es habitualmente entre 3 y 10 días, pero puede ser tan largo como 14 a 20 días, o incluso más largo siempre que se mantengan la viabilidad y proliferación continuada de las células.

En un aspecto especial, la presente divulgación se refiere a métodos para obtener células que reconocen MHC que comprenden, cuyos métodos comprenden poner en contacto una construcción de moléculas MHC como se describe en el presente documento y una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC en condiciones mediante las que las células que reconocen MHC se unen a la construcción de moléculas MHC, y aislar la construcción de moléculas MHC y las células que reconocen MHC unidas.

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

La divulgación se refiere además a métodos para producir las composiciones terapéuticas de la divulgación, cuyos métodos comprenden obtener células que reconocen MHC usando una construcción de moléculas MHC como se describe en el presente documento, expandir dichas células que reconocen MHC hasta un número clínicamente relevante, formular las células obtenidas en un medio adecuado para administración, y opcionalmente añadir adyuvantes y/o excipientes.

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

moléculas MHC antes de o después de la unión a las células que reconocen MHC.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Las células T específicas de antígeno se producen frecuentemente a frecuencias muy bajas. La baja frecuencia de las células T específicas de antígeno hace que estas células sean dianas difíciles para aislamiento inmunomagnético. Además, la afinidad de unión entre los complejos MHC-péptido y el TCR es relativamente baja (del orden de 10 μ M) comparado con la afinidad de unión de anticuerpos y sus moléculas diana (en el intervalo de 10⁻⁹-0,1 nM). La baja afinidad de unión de los complejos MHC-péptido puede compensarse introduciendo múltiples sitios de unión entre la fase sólida usada para el aislamiento de las células y el TCR en la superficie de las células T. En la presente divulgación, esto se consigue conjugando múltiples complejos MHC-péptido a moléculas poli-ligando. Mediante el acoplamiento de múltiples de dichas moléculas poli-ligando a la fase sólida, se incrementa la avidéz de unión a las células T para facilitar el aislamiento eficiente de las células T diana.

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

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

Como se ha mencionado anteriormente, la administración de las células expandidas puede ser por cualquier ruta conveniente. Típicamente, el número de células para cada administración debe ser aproximadamente 10⁹-10¹¹ células. Las células pueden administrarse adecuadamente en un volumen de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 1 litro, tal como aproximadamente 50 ml a aproximadamente 500 ml, aproximadamente 50 ml a aproximadamente 250 ml, aproximadamente 50 ml a aproximadamente 150 ml, o aproximadamente 50 ml a aproximadamente 100 ml, dependiendo de la ruta de administración y la enfermedad que se va a tratar. Las células pueden administrarse en una única dosis o como varias dosis. En determinados casos, la administración sólo una vez puede ser suficiente. En

general, deben proporcionarse varias dosis con intervalos de un día, una semana, dos semanas, un mes, o varios meses, etc. Por ejemplo, una dosis única puede proporcionarse una vez, o una dosis puede proporcionarse como un cebador, seguido de una o más administraciones, o un régimen de administración continuo como hasta cuatro dosis por semana, seguido de un mes sin administraciones, seguido de hasta cuatro dosis por semana (algunas veces con cantidad creciente o decreciente de las células), etc. Opcionalmente pueden usarse diferentes adyuvantes o combinaciones de adyuvantes en las diferentes administraciones. Éstos son todos ejemplos, y el régimen de administración óptimo depende de las células en cuestión y de varios otros factores. El experto en la materia sabrá fácilmente cómo optimizar esto. Por supuesto, pueden administrarse otros medicamentos simultáneamente con el fin de aumentar o apoyar el tratamiento.

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

Los recipientes para mezclar y almacenar la composición terapéutica de la divulgación pueden estar hechos de vidrio o varios materiales poliméricos. Los recipientes elegidos no deben afectar esencialmente el producto almacenado. Los recipientes pueden ser adecuadamente ampollas o viales tapados para mono o multidosis.

Usos de las moléculas MHC

En un aspecto especial, la presente divulgación se refiere a usos de moléculas MHC en métodos histológicos, y usos de moléculas MHC en métodos citológicos.

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

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

Todas las definiciones, explicaciones, e interpretaciones proporcionadas anteriormente también se aplican cambiando lo que haya que cambiar a este aspecto de la divulgación.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La molécula MHC que se va a usar puede ser una molécula MHC Clase I seleccionada del grupo que consiste en una cadena pesada, una cadena pesada

combinada con una β_2m , una cadena pesada combinada con un péptido, y un dímero cadena pesada/ β_2m con un péptido;

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

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

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

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

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

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

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

Cada entidad de unión puede tener unidas a la misma adecuadamente de 1 a 10 moléculas MHC, tal como de 1 a 9, de 1 a 8, de 1 a 7, de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, o 1 o 2 moléculas MHC. Dichas moléculas MHC pueden ser iguales o diferentes (es decir, de diferentes especies). Si las moléculas MHC están cargadas de péptido, dichos péptidos pueden ser iguales o diferentes. El número de moléculas MHC unidas a la entidad de unión sólo está limitado por la capacidad de la entidad de unión. Cuando más de una molécula MHC está unida a una entidad de unión, esto se denomina en el presente documento un multímero de moléculas MHC, por ejemplo un dímero (dos moléculas MHC), un trímero (tres moléculas MHC), y un tetrámero (cuatro moléculas MHC). Este número debe interpretarse como en promedio, véanse las explicaciones anteriores. Así, no es necesario que el número medio sea un número entero, sino que puede ser cualquier número entre dos números enteros (es decir, un número decimal).

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

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

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

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

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

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

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

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC montada en un soporte,
- (b) poner en contacto la muestra con una molécula MHC como se describe en el presente documento, y
- (c) determinar cualquier unión de la molécula MHC, unión que indica la presencia de células que reconocen MHC.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

1. Aplicabilidad de la presente divulgación en cáncer de mama

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

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

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

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

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

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

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

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

También, por la presente divulgación, dichos CTL pueden aislarse de un paciente por un procedimiento de separación inmunomagnética usando construcciones de moléculas MHC, cargadas con moléculas MHC cargadas de péptido que se unen específicamente a los CTL. Después del aislamiento, los CTL pueden expandirse, opcionalmente estimularse,

y re-introducirse en el paciente, bien solos como un tratamiento eficaz o como parte de un tratamiento.

3. Aplicabilidad de la presente divulgación en conexión con trasplante

5 La presente divulgación también puede usarse para seguir la respuesta de células T frente a determinados virus en pacientes trasplantados. Los pacientes trasplantados son susceptibles frecuentemente a ataques de virus debido a la terapia inmunosupresora necesaria para evitar el rechazo del injerto. Mediante la monitorización del desarrollo post-trasplante de células T específicas de virus que ayudan en virus posibles, puede ajustarse el tratamiento inmunosupresor u otra medicina preventiva para concordar el estado inmune del paciente. Esto puede hacerse usando

10 construcciones de moléculas MHC, en donde las moléculas MHC están cargadas con péptidos reconocidos por dichas células T que surgen de una infección en progreso. Los ejemplos de virus que un médico puede querer monitorizar son CMV (citomegalovirus) y EBV (virus de Epstein-Barr).

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

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

25 4. Aplicabilidad de la presente divulgación en conexión con diversas infecciones

La presente divulgación puede usarse para detectar y monitorizar la respuesta de las células T (o, más correctamente, los receptores de las células T específicos) en conexión con enfermedades complejas tales como gripe, tuberculosis, malaria, herpes simple, y clamidia. Las construcciones de moléculas MHC, en donde las moléculas MHC están

30 cargadas con los péptidos apropiados pueden aplicarse en la detección y monitorización.

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

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

40 5. Preparación de molécula SA amida poli acrílica

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

45 La estreptavidina (SA, Genzyme) se dializa toda la noche (100 mg en 5 ml, frente a 1.000 ml, 0,10 M NaCl, 2-4 °C, 10 kDa MwCO, cambio tres veces). En lo que sigue, todos los tampones se saturan con nitrógeno antes del uso. El éster N-hidroxisuccinimida del ácido acrílico (Sigma Chemical Co., número de catálogo A8060) almacenado en el congelador se deja permanecer a temperatura ambiente durante una hora antes de abrirlo y disolverlo en NMP seco (7 mg/ml) y se añade lentamente a una solución agitada de SA (en total 0,140 ml solución de NMP/ml, 5 mg/ SA/ml, 0,1 M NaCl, 25 mM tampón carbonato, pH 8,5) y se agita a 30 °C bajo atmósfera de nitrógeno durante 2 horas.

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

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

60 aproximadamente 3,0 mg SA por ml. La molécula puede marcarse con un marcador, por ejemplo, FITC o Alexa como se describe más adelante.

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

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

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

Las moléculas vehículo que son dextrano modificado en carboxilo o pululano modificado en carboxilo que tienen unidas a ellas un número de entidades de unión que son anticuerpo anti-biotina de conejo o SA pueden prepararse de la manera siguiente. El dextrano modificado en carboxilo o pululano modificado en carboxilo se disuelve y se añade N-hidroxisuccinimida (Aldrich N.º cat. 13067-2) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC, Aldrich, número de catálogo E6383, 191.7) (2,0 mg carbohidrato modificado en carboxilo/ml, 1,42 mg NHS-OH/ml, 0,59 mg EDAC/ml, 50 mM ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico ("MES", Aldrich, número de catálogo M8250), 100 mM NaCl, pH 6,0) seguido de agitación a temperatura ambiente durante una hora. Se añade la proteína de unión dializada, anticuerpo anti-biotina de conejo purificada por afinidad fab2 o SA (en total 1,06 mg carbohidrato modificado en carboxilo activado/ml, 5,3 mg anti-biotina de conejo/ml o 6,4 mg estreptavidina/ml, 50 mM MES, 100 mM NaCl, pH 6,0). Después de permanecer toda la noche a temperatura ambiente, cualesquiera grupos reactivos remanente se apantallan por la adición de 1/10 el volumen de la mezcla de reacción de un tampón que contiene etanolamina (110 mM etanolamina, 50 mM HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,0) y se agita durante 30 minutos a 30 °C. La solución que contiene la molécula vehículo conjugada con la entidad de unión se filtra a través de un filtro de polisulfona 20 my antes de purificarse de proteína sin unir mediante filtración en gel (FPLC, Pharmacia, S-500, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,2). Sólo la fracción claramente separada de la estreptavidina libre y no en el primer pico de exclusión se recoge como la fracción de conjugado. El grado de unión de anticuerpo o SA a la molécula vehículo puede calcularse a partir de la absorbancia UV a 278 nm. La molécula vehículo conjugada con la entidad de unión se concentra hasta aproximadamente 3,0 mg anticuerpo o proteína por ml. El conjugado se marca con una pluralidad de compuestos marcadores, por ejemplo, FITC o Alexa como se describe más adelante.

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

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

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

9. Preparación de construcciones de moléculas MHC

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

10. Construcción de moléculas MHC, en donde la molécula MHC está unida directamente a la molécula vehículo

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

La molécula MHC purificada (100 nM cadena pesada que contiene el péptido de interés y β_2m) se añade a dextrano activado con vinilsulfona (500 kDa, aproximadamente 25 % activado, en total 2 ng dextrano/ml, 10 ng molécula

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

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

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

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

Ejemplos

Los ejemplos que no caen bajo el alcance de las reivindicaciones adjuntas no forman parte de la invención.

Hasta ahora, se han usado varios ejemplos de unión específica de moléculas MHC Clase I y II oligomerizadas, por ejemplo, tetrámeros, para identificar poblaciones de células T específicas de epítipo peptídico. La alta avidez de los complejos MHC oligoméricos, por ejemplo, tetrámeros, ha añadido una herramienta nueva y significativa para analizar respuestas de células T clonales frente a organismos patogénicos y antígenos. En los ejemplos siguientes, se ha abordado la unión de construcciones de moléculas MHC multivalentes de la divulgación.

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

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

EJEMPLO 1

Producción de moléculas MHC poli-ligando y tetrámeros

A. Producción de moléculas vehículo con entidades de unión

Dextrano activado con vinilsulfona

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

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

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

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

Después de 6 horas, la mezcla de reacción se añadió a una solución de dextrano activado con vinilsulfona

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

5 Cualquier grupo reactivo remanente se apantalló por la adición de 1/10 volumen de mezcla de reacción de un tampón que contiene etanolamina (110 mM etanolamina, 50 mM HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,0) y se agitó durante 30 minutos a 30 °C.

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

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

Molécula vehículo dextrano	SA por dextrano	FITC por SA	Concentración de dextrano (mol/l)
150	4,4	2,7	$61,1 \times 10^{-8}$
270	6,9	2,6	$54,7 \times 10^{-8}$
500	13,6	2,7	$31,2 \times 10^{-8}$

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

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

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

25 La solución de HRP se añadió a una solución de dextrano activado con vinilsulfona (aproximadamente 25 % activado) de 70, 150 o 270 kDa (en total 40,0 mg HRP/ml, 1,6 mg dextrano/ml, 25 mM carbonato, 0,1 M NaCl, pH 8,5) y se agitó en un baño de agua (30 °C, 6,0 horas). La solución de estreptavidina se añadió a la mezcla de reacción (en total 9,14 mg estreptavidina/ml, 1,06 mg dextrano/ml, 26,67 mg HRP/ml, 25 mM carbonato, 0,10 M NaCl, pH 8,5) y se agitó toda la noche en un baño de agua (30 °C, 18 horas).

30 Cualquier grupo reactivo remanente se apantalló por la adición de 1/10 volumen de mezcla de reacción de un tampón que contiene etanolamina (110 mM etanolamina, 50 mM HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,0) y se agitó durante 30 minutos a 30 °C.

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

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

Molécula vehículo dextrano	SA por dextrano	HRP por dextrano	Concentración de dextrano (mol/l)
70	3,0	2,3	$10,5 \times 10^{-8}$
150	5,4	3,7	$7,0 \times 10^{-8}$
270	8,0	5,3	$4,6 \times 10^{-8}$

45 B. Producción de moléculas MHC cargadas con péptido

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

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

55 Se generaron complejos HLA Clase I específicos de epítipo peptídico *in vitro* usando una estrategia de "plegamiento

por dilución" en donde las preparaciones altamente purificadas de molécula de cadena pesada de HLA Clase I desnaturalizada (aproximadamente 10-20 μM en urea 8 M) A0201, 1-275) se renaturalizaron por incubación en un tampón de dilución de 100 veces (la concentración final de cadena pesada es así aproximadamente 100-200 nM) que contenía el péptido de interés (10 μM) y $\beta_2\text{m}$ (1 μM), durante 16 horas a 18 °C. La cadena pesada de HLA Clase I plegada erróneamente se precipitó por centrifugación antes de la purificación de la molécula HLA Clase I plegada *de novo* por cromatografía de exclusión por tamaño G75 según un procedimiento convencional. La fracción de molécula HLA plegada A0201 fue ruinosamente aproximadamente 40-50 % de la cantidad total de molécula de cadena pesada HLA A0201 añadida a la reacción de plegamiento. La fracción de molécula de cadena pesada plegada erróneamente contenía enlaces disulfuro inapropiados y no estaba disponible para renaturalización. Este esquema de plegamiento, descrito anteriormente, fue útil para la generación rápida de una diversidad de complejos MHC Clase I monoméricos cargados con péptido codificados por los complejos de gen HLA y H-2 polimórficos. Los complejos purificados finalmente se monobiotinilaron enzimáticamente utilizando proteína ligasa BIR A como describe el fabricante (AVIDITY; Denver, Co, EEUU).

C. Producción de moléculas HLA Clase I vacías de péptido

Se produjo MHC Clase I vacía de péptido en un proceso en donde los complejos MHC Clase I mono-biotinilados funcionales (véase, el ejemplo 1B) se desnaturalizaron inicialmente por la adición de urea (8M) o guanidina (6M). Los tampones caotróficos disociaron las subunidades estructurales de la molécula del complejo Clase I, dejando moléculas de cadena pesada biotinilada soluble libre y $\beta_2\text{m}$ soluble libre disponibles para purificación bioquímica. La molécula de cadena pesada se excluyó del $\beta_2\text{m}$ y péptido disociado por cromatografía de exclusión por tamaño G75 según un procedimiento convencional. La molécula de cadena pesada purificada forma espontáneamente un complejo heterodímero receptor de péptido que consiste en cadena pesada y ligera en un tampón de plegamiento que contiene $\beta_2\text{m}$ en exceso (véase el Ejemplo 1:B anteriormente en el presente documento). El dímero HLA Clase I vacío de péptido permaneció estable en exceso de $\beta_2\text{m}$ y pudo ligarse a estreptavidina para formar la construcción vacía de péptido de la divulgación o tetrámero vacío de péptido. El péptido (1 μM) de interés se añadió durante o después del proceso de ligación con dextrano soluble o conjugado con SA para generar moléculas MHC de unión a TCR en la forma de construcciones de moléculas MHC de la divulgación o tetrámeros de moléculas MHC.

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

Las preparaciones de dextranos conjugados con SA de diferentes tamaños moleculares se mezclaron con cantidades de complejos HLA correspondientes a una proporción de dos moléculas HLA Clase I biotiniladas por molécula SA. La molécula HLA se añadió directamente a una solución de dextranos conjugados con SA. Así, se formaron construcciones de moléculas MHC que comprenden

(1) una molécula vehículo que es un dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 moléculas HLA Clase I biotiniladas (moléculas MHC) mediante aproximadamente 13,6 SA marcada con FITC (entidades de unión) (de media 2 moléculas HLA Clase I por SA), cada SA marcada de media con 2,7 FITC,

(2) una molécula vehículo que es un dextrano 270 kDa que tiene unido a él aproximadamente 13,8 moléculas HLA Clase I biotiniladas (moléculas MHC) mediante aproximadamente 6,9 SA marcada con FITC (entidades de unión) (de media 2 moléculas HLA Clase I por SA), cada SA marcada de media con 2,6 FITC,

(3) una molécula vehículo que es un dextrano 150 kDa que tiene unido a él aproximadamente 8,8 moléculas HLA Clase I biotiniladas (moléculas MHC) mediante aproximadamente 4,4 SA marcada con FITC (entidades de unión) (de media 2 moléculas HLA Clase I por SA), cada SA marcada de media con 2,7 FITC,

(4) una molécula vehículo que es un dextrano 70 kDa que tiene unido a él aproximadamente 6,0 moléculas HLA Clase I biotiniladas (moléculas MHC) mediante aproximadamente 3,0 SA (entidades de unión) (de media 2 moléculas HLA Clase I por SA), cada dextrano marcado de media con 2,3 enzimas HRP,

(5) una molécula vehículo que es un dextrano 270 kDa que tiene unido a él aproximadamente 10,8 moléculas HLA Clase I biotiniladas (moléculas MHC) mediante aproximadamente 5,4 SA (entidades de unión) (de media 2 moléculas HLA Clase I por SA), cada dextrano marcado de media con 3,7 enzimas HRP,

(6) una molécula vehículo que es un dextrano 270 kDa que tiene unido a él aproximadamente 16,0 moléculas HLA Clase I biotiniladas (moléculas MHC) mediante aproximadamente 8,0 SA (entidades de unión) (de media 2 moléculas HLA Clase I por SA), cada dextrano marcado de media con 5,3 enzimas HRP.

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

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

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehículo dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el análogo de péptido MART-1 (ELAGIGILTV) y β_2m mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,7 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 1),

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehículo dextrano 270 kDa que tiene unido a él 13,8 moléculas HLA A0201 biotiniladas en complejo con el análogo de péptido MART-1 (ELAGIGILTV) y β_2m mediante 6,9 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,6 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 2),

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehículo dextrano 150 kDa que tiene unido a él 8,8 moléculas HLA A0201 biotiniladas en complejo con el análogo de péptido MART-1 (ELAGIGILTV) y β_2m mediante 4,4 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,7 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 3),

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehículo dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 HLA A0201 biotiniladas en complejo con los aminoácidos de la proteína matriz de gripe 58-66 (GILGFVFTL) y β_2m mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,7 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 4),

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehículo dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el péptido R9V de P53 de tipo salvaje (RMPEAAPPV) y β_2m mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,7 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 5),

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehículo dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el péptido G11V de P53 de tipo salvaje (GLAPPQHILRV) y β_2m mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,7 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 6),

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehículo dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 HLA A0201 vacías de péptido biotiniladas mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,7 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 7),

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehículo dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el péptido gp100 KTWGQYWQV y β_2m mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,7 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 8),

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehículo dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 cadena pesada de HLA A0201 en complejo con el análogo de péptido MART-1 (ELAGIGILTV) y β_2m yodado mediante 13,6 SA (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA), que tiene una radiactividad de 100.000 cpm/muestra) (construcción de moléculas MHC 9),

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehículo dextrano 270 kDa que tiene unido a él 16,0 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el análogo de péptido Mart-1 (ELAGIGILTV) y β_2m mediante 8,0 SA (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA) y 5,3 enzimas HRP al dextrano (construcción de moléculas MHC 10),

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehículo dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el análogo de péptido sur1/M2 (LMLGEFLKL) y β_2m mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,7 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 11),

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehículo dextrano 150 kDa que tiene unido a él 10,8 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el análogo de péptido MART-1 (ELAGIGILTV) y β_2m mediante 5,4 SA (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA) y 3,7 enzimas HRP al dextrano (construcción de moléculas MHC 12),

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehículo dextrano 70 kDa que tiene unido a él 16,0 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el análogo de péptido MART-1 (ELAGIGILTV) y β_2m mediante 3,0 SA (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA) y 2,3 enzimas HRP al dextrano (construcción de moléculas MHC 13),

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehículo dextrano 500 kDa que tiene unido a él 27,2 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el péptido MAGE-3 (FLWGPRALV) y β_2m mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 2 moléculas HLA A0201 por SA, y de media 2,7 FITC por SA) (construcción de moléculas

MHC 14),

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehículo dextrano 500 kDa que tiene unido a él 14,1 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el análogo de péptido MART-1 (ELAGIGILTV) y β_2m mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 1 molécula HLA A0201 por SA, y de media 2 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 15),

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehículo dextrano 500 kDa que tiene unido a él 14,1 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el análogo de péptido MART-1 (ELAGIGILTV) y β_2m y 7,1 moléculas MIC A mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 1 molécula HLA A0201 por SA, y de media 2 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 16),

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehículo dextrano 500 kDa que tiene unido a él 14,1 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el péptido gp100 KTWGQYWQV y β_2m mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 1 molécula HLA A0201 por SA, y de media 2 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 17),

una construcción de moléculas MHC que comprende la molécula vehículo dextrano 500 kDa que tiene unido a él 14,1 HLA A0201 biotiniladas en complejo con el péptido gp100 KTWGQYWQV y β_2m y 7,1 moléculas MIC A mediante 13,6 SA marcada con FITC (de media 1 molécula HLA A0201 por SA, y de media 2 FITC por SA) (construcción de moléculas MHC 18).

EJEMPLO 2

Producción de tetrámeros de moléculas MHC

La molécula HLA específica de epítipo peptídico usada para los tetrámeros se generó como se describe en el Ejemplo 1, B. Los tetrámeros se formaron por la adición secuencial de pequeñas cantidades de SA conjugada con PE (Molecular Probes, Holanda) a una solución de complejos HLA biotinilados. La cantidad final de complejo HLA en la mezcla debe ser cuatro veces la cantidad de SA para asegurar la saturación (cuatro sitios de unión de biotina por complejo SA).

Mediante este procedimiento, se prepararon los tetrámeros siguientes:

Un tetrámero marcado con PE que consiste en cuatro HLA A0201 biotiniladas en complejo con el péptido MART-1 modificado (ELAGIGILTV) y β_2m (tetrámero 1),

un tetrámero marcado con PE que consiste en cuatro HLA A0201 biotiniladas en complejo con el péptido gp100 (KTWGQYWQV) y (tetrámero 2) y β_2m ,

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

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

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

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

EJEMPLO 3

La unión dependiente de la dosis de construcciones de moléculas MHC según la divulgación en comparación con tetrámeros de moléculas MHC a la célula T es específica de péptido

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

Se utilizaron clones de células T previamente establecidos y caracterizados "internamente", denominados 5/127 y 5/130, que reaccionaban frente a antígenos de tumor específicos de melanoma, para analizar la unión de las construcciones de moléculas HLA (es decir, construcciones de moléculas MHC) de la divulgación a TCR en las superficies celulares por citometría de flujo según un protocolo convencional de citometría de flujo. Brevemente, se incubaron 5×10^5 células en 50 μ l de "tampón FACS" (solución salina tamponada con fosfato (PBS), 10 mg/ml albúmina de suero bovino (BSA), 0,2 % de azida) bien con las construcciones de moléculas MHC poli-ligando de la divulgación

o los tetrámeros, que presentan los péptidos de interés. A no ser que se indique otra cosa, las células se lavaron una vez en el tampón FACS y se analizaron en un citómetro de flujo Becton Dickenton FACSCalibur.

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

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

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

Se usaron los siguientes tetrámeros de moléculas MHC:

tetrámero 1,
tetrámero 2.

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

Los clones de células T 5/127 y 5/130 se descongelaron y crecieron 24 horas a 37 °C en presencia de 50U IL-2 y 10 % suero humano. Aproximadamente 5×10^5 clones de células T se incubaron 1 hora a 22 °C con dosis graduales de construcción de moléculas MHC de la divulgación (construcción de moléculas MHC 1: 0-9,36 nM, diluciones de 2 veces, véase la Figura 25; construcción de moléculas MHC 2: 0-27,5 nM, diluciones de 2 veces, véase la Figura 25; construcción de moléculas MHC 3: 0-37,5 nM, diluciones de 2 veces, véase la Figura 25) o tetrámeros marcados con PE (tetrámeros 1 y 2; 0-200 nM, diluciones de 2 veces, véase la Figura 25). Después de la incubación, las células se lavaron sólo una vez para evitar la disociación de construcciones o tetrámero de moléculas MHC unidas con baja avidéz, y se analizaron por citometría de flujo según procedimientos convencionales de citometría de flujo para construcción de moléculas MHC (resultados mostrados en la Figura 25B) y tetrámero marcado con PE (resultados mostrados en la Figura 25A) unidos a células.

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

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

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

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

EJEMPLO 4

Unión de construcciones de moléculas MHC de la divulgación y tetrámeros a línea de células T específica de gripe

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

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

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

Se usaron las siguientes construcciones de moléculas MHC de la divulgación:

construcción de moléculas MHC 4,
construcción de moléculas MHC 5,
construcción de moléculas MHC 6.

Se usaron los siguientes tetrámeros:

tetrámero 3,
tetrámero 4,
tetrámero 5.

Los tetrámeros 3-5 se usaron para comparación.

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

Las células se incubaron durante 90 minutos a 22 °C en dosis graduales de las construcciones de la divulgación (0-32 nM, diluciones de 2 veces, véase la Figura 26) o los tetrámeros (0-112 nM, diluciones de 2 veces, véase la Figura 26), se lavaron una vez y se analizaron por citometría de flujo según procedimientos convencionales de citometría de flujo para construcción de molécula y tetrámero unido a célula, respectivamente.

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

EJEMPLO 5

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

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

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

Construcción de moléculas MHC 1.

Se usó el siguiente tetrámero:

Tetrámero 1.

Brevemente, se incubaron 5×10^5 clones de células T específicos de MART-1 (5/127) en 50 μ l de tampón FACS (PBS, 10 mg/ml BSA, 0,2 % de azida) con las construcciones de moléculas MHC poli-ligando de la divulgación o los tetrameros, todos presentando péptidos de interés. Los clones de células T se incubaron en dosis graduales (diluciones de 2 veces, véase la Figura 27) de la construcción de la divulgación o el tetrámero, ambos presentando el análogo del péptido relacionado con MART-1 ELAGIGILTV. Las células se incubaron a temperatura ambiente (22 °C). Se tomaron alícuotas de las células a diferentes puntos de tiempo (véase la Figura 27) se lavaron y midieron por citometría de flujo según procedimientos convencionales para citometría de flujo para construcción (mostrada en la Figura 27B) o tetrámero (mostrado en la Figura 27A) unidos a células. Como se muestra en la Figura 27A, en el caso del tetrámero, se obtuvo una unión de estado estacionario después de 1 hora de incubación usando altas concentraciones de tetrámero (112 nM), mientras menores concentraciones (14-56 nM) no alcanzaron el estado estacionario en el intervalo de tiempo medido. En comparación, la construcción de la divulgación alcanzó un nivel de estado estacionario en los 60 minutos usando una concentración significativamente menor de construcción (16 nM).

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

EJEMPLO 6

Disociación de construcciones de la divulgación unidas a células

En este experimento, se investigó la disociación de construcciones de la divulgación unidas a células.

Se usó la siguiente construcción de moléculas MHC:

Construcción de moléculas MHC 1.

Se incubaron clones de células T (5/127) con la construcción de la divulgación que presentaba el análogo del péptido relacionado con MART-1 ELAGIGILTV. Las células (5×10^5) se incubaron 1 hora a 22 °C y se lavaron una vez y se incubaron a 4 °C, 22 °C y 37 °C, respectivamente, en tampón FACS (PBS, 10 mg/ml BSA, 0,2 % azida) que contenía 50 nM anticuerpo monoclonal específico de CD8 para prevenir la re-unión de la construcción que se disociaba. A diferentes puntos de tiempo (0, 60, 90, 120 minutos, respectivamente), se tomaron alícuotas de las células, se lavaron y se analizaron para construcciones unidas a células por citometría de flujo según un protocolo convencional para citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 28. A 4 °C, la vida media de la unión de la construcción fue aproximadamente 90 minutos, que se redujo hasta aproximadamente 50 y 30 minutos a 22 °C y 30 °C, respectivamente. La disociación bifásica de las construcciones de las células incubadas a 37 °C indicó que tenía lugar algún grado de internalización de la construcción al interior de las células. Alternativamente, la disociación bifásica podía explicarse con interacción compleja entre la construcción y contra receptores en la superficie de las células T a 37 °C comparado con la unión de la misma construcción a temperaturas más bajas.

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

EJEMPLO 7

Unión de la construcción de la divulgación: el impacto de anticuerpos

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

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

Construcción de moléculas MHC 1.

Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales:

BB7.2 (específico de HLA A0201), W6/32 (específico general de HLA A, B, C), BBM1 (específico de β_2m humano), y anti-células T humanas de ratón, CD8 Clon DK25 (DAKO N.º de Código M0707) (anticuerpo (específico de CD8).

El clon de células T específico de MART-1 5/127 se incubó con una mezcla de construcción 2 nM que presentaba el epítomo peptídico relacionado con MART-1 con o sin 10 nM anticuerpo monoclonal (BB7.2, W6/32, BBM1 y específico de CD8, respectivamente) como se indica en la Figura 29A. Las células se incubaron durante 90 minutos a 22 °C, se lavaron una vez y se analizaron por citometría de flujo según procedimientos convencionales para construcción unida

a células. Los anticuerpos monoclonales B7.1 y W6/32 que reaccionaban con epítomos que se encontraban muy cerca del sitio de unión a péptido de HLA A0201 inhibieron como se muestra en la Figura 29A la unión de la construcción hasta un nivel cercano al fondo (obteniéndose la señal de fondo incubando las células con 10 nM construcción marcada con FITC sin moléculas HLA).

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

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

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

EJEMPLO 8

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

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

Se usaron las siguientes construcciones de moléculas MHC de la divulgación:

Construcción de moléculas MHC 1, sin embargo, con diferentes cantidades de HLA A0201, véase a continuación,
Construcción de moléculas MHC 2, sin embargo, con diferentes cantidades de HLA A0201, véase a continuación,
Construcción de moléculas MHC 3, sin embargo, con diferentes cantidades de HLA A0201, véase a continuación.

Se añadieron cantidades graduales de complejos HLA A0201 biotinilados recombinantes que presentaban el análogo del péptido MART-1 (ELAGIGILTV) a disoluciones individuales de las construcciones que comprenden moléculas vehículo dextrano con diferentes tamaños moleculares, concretamente moléculas vehículo dextrano 150, 270 y 500 kDa, respectivamente. Más específicamente, se incubó una solución 80 nM de dextrano 500 kDa (conjugado con 14 SA, cada uno marcado de media con 2 FITC) en tampón FACS (PBS, 10 mg/ml BSA, 0,2 % de azida) con un exceso de 88 (7.040 nM HLA A0201), 44 (3.520 nM) y 14 (1.121 nM) veces de complejos HLA A0201 mono-biotinilados, respectivamente. La mezcla de reacción se incubó 60 minutos a 22 °C para obtener estado estacionario entre HLA A0201 y las moléculas SA conjugadas con el dextrano. A partir de las proporciones de HLA A0201 y dextrano (88, 44, 14 moléculas HLA a una molécula de dextrano) pudieron calcularse las proporciones de HLA a SA durante la ligación correspondientes a 6,5, 3,25 y 1, respectivamente. Debido a la alta afinidad de SA y MHC biotinilada, se esperaba que la ligación entre HLA A0201 y SA por dextrano resultaba en construcciones de moléculas MHC completamente saturadas (exceso de 88 veces de HLA), casi saturadas (exceso de 44 veces de HLA) y parcialmente saturadas (exceso de 14 veces de HLA). Asumiendo 4 sitios de unión por SA, las construcciones de moléculas están así cargadas con 54,4, 44,2 y 14,1 moléculas de HLA A0201 por dextrano. Las disoluciones se diluyeron 4 veces (concentración final de la construcción de moléculas MHC de 20 nM) antes del uso para tinción de células T por citometría de flujo según un protocolo convencional.

En un procedimiento similar, una preparación 145 nM SA/dextrano (270 kDa, 7 SA por dextrano, cada SA marcado de media con 2 FITC) se ligó con HLA A0201 biotinilado. Las concentraciones de HLA A0201 usadas para el proceso de ligación fueron un exceso de 48,5, 24,2 y 8,1 veces de la concentración de dextrano. La proporción de HLA:SA pudo calcularse a 7, 3,5 y 1,1, respectivamente. Asumiendo 4 sitios de unión por SA, las construcciones de moléculas están así cargadas con 27,6, 24,2 y 7,6 moléculas de HLA A0201 por dextrano. Las disoluciones se diluyeron hasta 20 nM antes de la tinción de células T según un procedimiento convencional.

En un procedimiento similar, una preparación 244 nM SA/dextrano (150 kDa, 4,4 SA por dextrano, cada SA marcado de media con 2 FITC) se ligó con HLA A0201 biotinilado. Las concentraciones de HLA A0201 usadas para el proceso de ligación correspondieron a un exceso de 28,8 (7.040 nM HLA A0201), 14,4 (3.520 nM HLA A0201) y 7,2 (1.760 nM HLA A0201) veces de la concentración de dextrano. La proporción de HLA:SA pudo calcularse a 6,5, 3,3 y 1,6, respectivamente. Asumiendo 4 sitios de unión por SA, las construcciones de moléculas estaban así cargadas con 17,6, 14,5 y 7,0 moléculas de HLA A0201 por dextrano. Las disoluciones se diluyeron hasta 20 nM antes de la tinción de células T según un procedimiento convencional.

Los clones de células T se incubaron durante 60 minutos a 22 °C antes de la tinción del clon de células T (5/127). Los clones de células T se incubaron 60 minutos a temperatura ambiente con disoluciones 20 nM de las construcciones de moléculas MHC cargadas con diferentes cantidades de HLA A0201. Las células se lavaron posteriormente una vez y se analizaron para construcción unida a células por citometría de flujo según un procedimiento convencional de citometría de flujo. Todas las construcciones se unieron como se esperaba específicamente al clon 5/127 (resultados mostrados en la Figura 30).

La construcción que comprende las moléculas vehículo dextrano mayores (500 kDa) se conjugó - de media - con 13,6 moléculas de estreptavidina con un número teórico de sitios de unión para moléculas HLA biotiniladas de aproximadamente 54 por molécula de dextrano (asumiendo 4 sitios de unión a biotina por SA). En comparación, la construcción que comprende las moléculas vehículo dextrano 270 kDa y 150 kDa se conjugaron con 6,9 y 4,4 moléculas de estreptavidina por dextrano, respectivamente, con un número teórico de sitios de unión de biotina correspondiente a 42 y 17 moléculas HLA Clase I biotiniladas, respectivamente.

Como se muestra en la Figura 30, las construcciones que comprende la molécula vehículo dextrano 500 kDa se unieron óptimamente a las células T cuando se cargaban con un total de 44 moléculas HLA Clase I por molécula vehículo dextrano. En comparación, las construcciones que comprenden las moléculas vehículo dextrano 270 y 150 kDa, respectivamente, se unieron óptimamente cuando se cargaron con un total de 24,2 y 14,5 moléculas HLA Clase I por dextrano (correspondiente a aproximadamente 4 moléculas HLA unidas por SA, respectivamente). La densidad observada de HLA Clase I/dextrano correspondió bien con 4 moléculas HLA Clase I/molécula SA conjugado con la molécula de dextrano. La reducción observada de la tinción de células T usando las construcciones de moléculas MHC generadas en exceso de moléculas HLA pudo deberse a la inhibición por moléculas monoméricas HLA no unidas. Así, se concluyó que las construcciones de moléculas MHC de la divulgación se unían óptimamente a células T específicas de péptido cuando todos los sitios de unión a biotina disponibles de la molécula vehículo estaban saturados durante el proceso de ligación. El exceso de molécula MHC monomérica no unida inhibió, sin embargo, la interacción entre construcciones de moléculas MHC y TCR específicos. Así, el proceso de ligación debería realizarse, consecuentemente, con una proporción 1:1 de moléculas MHC a sitios de unión.

EJEMPLO 9

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

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

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

Construcción de moléculas MHC 1.

Se usó el siguiente tetrámero:

Tetrámero 1.

El tetrámero se usó para comparación.

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

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

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

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

EJEMPLO 10

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

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

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

Construcción de moléculas MHC 7.

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

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

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

Tetrámero 6.

También se usaron el tetrámero 1 y tetrámero 2.

La construcción de moléculas HLA vacía de péptido de la divulgación se formó por incubación de 60 pmol de cadena pesada mono-biotinilada (2 µl de solución madre con 30 µM molécula de cadena pesada obtenida como se describe en el Ejemplo 1.C.) con 1 nmol de β_2m en 198 µl de tampón de dilución (20 mM tris, pH 6,8, 150 mM NaCl) durante 2 horas a 18 °C. El dímero formado (aproximadamente 270 nM) era estable en este tampón durante varios días cuando se almacenó a 4 °C. La construcción de moléculas HLA vacía de péptido de la divulgación se formó por la adición de moléculas vehículo estreptavidina dextrano (500 kDa, 13,6 SA/dextrano, añadido a una concentración final de 10 nM) a 100 µl de solución.

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

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

Los tetrámeros se generaron en una estrategia similar excepto que se añadió SA marcado con PE secuencialmente a una concentración final de 70 nM, para asegurar una proporción de 1:4 entre moléculas SA y HLA, antes de la adición del análogo del péptido MART-1 ELAGIGILTV o péptido gp100 KTWGQYWVOV. El tetrámero se usó para comparación.

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

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

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

Como se muestra en la Figura 32, la construcción que presentaba el péptido MART-1 (ELAGIGILTV) de la divulgación proporcionó una distinción clara entre células T positivas (1,2 % células teñidas positivamente) mientras la construcción que presentaba el péptido gp100 (KTWGQYWVOV) tiñó aproximadamente el 0,4 %. Aunque utilizados a

concentraciones 7 veces mayores ninguno de los tetrámeros correspondientes fueron capaces de teñir las células T (datos no mostrados).

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

EJEMPLO 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EJEMPLO 12

Tinción de células T específicas de tumor

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

Se usaron las siguientes construcciones de moléculas MHC:

Construcción de moléculas MHC 8
Construcción de moléculas MHC 11.

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

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

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

- 10 Los portaobjetos se incubaron en primer lugar (45 minutos) con (i) el anticuerpo primario; anti-CD8 (clon anti-CD8, HIT8a, N.º cat. 550372, Pharmingen, San Diego, CA; EEUU, dilución 1:100 en tampón PBS), seguido de (ii) anti-ratón de cabra conjugado con Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, EEUU, diluido 1:500 en PBS) durante 45 minutos y finalmente (iii) se incubó con la construcción de moléculas MHC poli-ligando durante 75 minutos (100 µl, 20 10⁻⁹ M construcción en PBS).

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

- 20 La población completa de TILS citotóxicos en biopsias tumorales pudo visualizarse por anticuerpos específicos anti-CD8 conjugados con Cy3 (Figura 25, carriles izquierdos) mientras os clones de células T específicos de SUR1M2 pudieron visualizarse con la construcción de moléculas MHC poli-ligando conjugada con FITC (carril derecho en la parte superior). La doble tinción de células T positivas para CD8 y específicas de epítipo peptídico se reveló en las fotografías fusionadas en los carriles del centro (parte superior). Otro péptido de unión HLA A0201, el antígeno gp100 asociado a melanoma presentado por la construcción de moléculas MHC, no tiñó TILS en el tejido de cáncer de mama examinado (carril derecho, centro). En un segundo control, la construcción de moléculas MHC poli-ligando SUR1M2 no tiñó células T en biopsias de cáncer de mama de pacientes negativos para A2 (parte derecha, inferior).

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

- 30 EJEMPLO 13

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

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

Se usó la siguiente construcción de moléculas MHC:

- 40 Construcción de moléculas MHC 11.

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

- 45 En la Figura 39, el carril izquierdo muestra la tinción de Cy-3 de células T CD8+ en muestras de tejido de tumor (parte superior) y nódulo linfático (parte inferior). El carril derecho muestra la tinción localizada por la construcción de moléculas MHC A2-SUR1M2 FITC. La doble tinción de células T positivas para CD8 y específicas del péptido SUR1M2 se representa en el carril central mostrando las fotografías fusionadas.

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

EJEMPLO 14

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

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

- 60 Se usó la siguiente construcción de moléculas MHC:

Construcción de moléculas MHC 1.

- 65 Los detalles experimentales de este Ejemplo fueron similares a los proporcionados en el Ejemplo 12, excepto que el tejido fue de un paciente con melanoma y que la construcción de moléculas MHC poli-ligando presentaba el análogo

del péptido MART-1 (ELAGIGILTV).

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

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

EJEMPLO 15

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

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

Se usaron las siguientes construcciones de moléculas MHC:

Construcción de moléculas MHC 1
Construcción de moléculas MHC 14.

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

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

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

EJEMPLO 16

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

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

Se usaron las siguientes construcciones de moléculas MHC:

Construcción de moléculas MHC 8
Construcción de moléculas MHC 14.

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

Se concluyó que la inmunización de pacientes con DC pulsadas con un epítipo de péptido gp100 dio lugar a la infiltración de células T específicas que reconocían el péptido presentado por la construcción de moléculas MHC poli-

ligando HLA A0201 (Figura 42B) pero no un epítipo MAGE-3 (Figura 42A).

EJEMPLO 17

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

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

Se usó la siguiente construcción de moléculas MHC:

Construcción de moléculas MHC 13.

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

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

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

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

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

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

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

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

40

EJEMPLO 18

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

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

Se usaron las siguientes construcciones de moléculas MHC:

50

Construcción de moléculas MHC 15,

Construcción de moléculas MHC 16,

Construcción de moléculas MHC 17,

Construcción de moléculas MHC 18.

55

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

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

65

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

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

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

EJEMPLO 19

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

Varias moléculas vehículo (como se ejemplifica por dextranos 150, 270 y 500 kDa, respectivamente) que tienen unidas a ellas una pluralidad de entidades de unión (como se ejemplifica por estreptavidina (SA)) se prepararon según el procedimiento descrito más adelante. Las moléculas MHC y/o compuestos biológicamente activos pueden unirse posteriormente. El número teórico de sitios de acoplamiento a cada SA es 4, lo que significa que la capacidad de carga de cada molécula SA-dextrano es 22,4 ($4 \times 5,6$), 41,2 ($4 \times 10,3$) y 68 ($4 \times 17,0$). Además, moléculas MHC/compuestos biológicamente activos pueden unirse a la molécula de dextrano directamente, haciendo así la capacidad de carga incluso mayor.

SA-dextrano (150, 270, 500 kDa)

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

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

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

EJEMPLO 20

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

Mediante los procedimientos descritos a continuación, se prepararon varias moléculas vehículo (como se ejemplifica por dextranos 150, 270 y 500 kDa, respectivamente) que tienen unidas a ellas una pluralidad de entidades de unión (como se ejemplifica por estreptavidina (SA)) marcadas con una pluralidad de compuestos marcadores (como se ejemplifica por Alexa 647). Las moléculas MHC y/o los compuestos biológicamente activos pueden unirse posteriormente. El número teórico de sitios de acoplamiento a cada SA es 4, lo que significa que la capacidad de carga de cada molécula SA-dextrano es 22,4 ($4 \times 5,6$), 41,2 ($4 \times 10,3$) y 68 ($4 \times 17,0$). Además, las moléculas MHC/los compuestos biológicamente activos pueden unirse a la molécula de dextrano directamente, haciendo así la capacidad de carga incluso mayor.

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

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

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

Molécula vehículo dextrano	SA por dextrano (de media)	Alexa 647 por SA (de media)	Concentración de dextrano (mol/l)
150	5,6	2,7	60×10^{-8}
270	10,3	2,6	50×10^{-8}
500	17,0	2,7	20×10^{-8}

EJEMPLO 21

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

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

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

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

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

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

EJEMPLO 22

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

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

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

Las moléculas de anti-biotina de conejo dextrano obtenidas en el Ejemplo 21 se marcaron con Alexa 532 o Alexa 647 según las directrices generales proporcionadas por el fabricante del Kit marcador de Proteína Alexa Fluor 532

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

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

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

Molécula vehículo dextrano	Anticuerpo por dextrano (de media)	Alexa 532 por anticuerpo (de media)	Concentración de dextrano (mol/l)
150	8,4	3,0	$165,5 \times 10^{-8}$
270	19,5	2,9	$69,4 \times 10^{-8}$

Molécula vehículo dextrano	Anticuerpo por dextrano (de media)	Alexa 647 por anticuerpo (de media)	Concentración de dextrano (mol/l)
150	7,21	2,7	150×10^{-8}
270	11,2	2,6	65×10^{-8}

EJEMPLO 23

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

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

Preparación de anti-biotina de conejo dextranos marcado con FITC

Los anti-biotina de conejo dextranos del Ejemplo 21 (dextranos 150 kDa y 270 kDa) se usaron para el marcaje con FITC. El vial de FITC (FITC (isotiocianato de fluoresceína), Molecular Probes, número de producto F-1906) almacenado en el congelador se dejó a temperatura ambiente durante una hora antes de abrirlo. Se añadió una solución de FITC (10,1 mg/ml NMP) a mezclas agitadas de moléculas anti-biotina de conejo dextrano (en total 0,750 ml, concentración de molécula equivalente a 1,5 mg anticuerpo/ml, 0,0487 mg FITC/ml, equivalente a aproximadamente 8,3 FITC por anticuerpo, 0,1 M NaCl, 200 mM tampón carbonato, pH 8,5, 30 °C, una hora en la oscuridad). Cualesquiera grupos reactivos remanentes se apantallaron por la adición de 1/10 de volumen de mezcla de reacción de un tampón que contiene etanolamina (110 mM etanolamina, 50 mM HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,0), y se agitó durante 30 minutos a 30 °C. Las dos diferentes moléculas poliméricas anti-biotina de conejo marcadas con FITC se purificaron de fluoresceína no unida por diálisis en un aparato *float-a-lyzer* (frente a 500 ml de 0,10 M NaCl, 2-4 °C, en la oscuridad, 10 kDa MwCO, cambiado tres veces), 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,2).

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

Molécula vehículo dextrano	Anticuerpo por dextrano (de media)	Fluoresceína por anticuerpo (de media)	Concentración de dextrano (mol/l)
150	8,4	1,7	$125,2 \times 10^{-8}$
270	19,5	1,8	$41,6 \times 10^{-8}$

EJEMPLO 24

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

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

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

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

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

REFERENCIAS

1. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, y Davis MM, Science 274 (5284), 94-96 (October 1996), "Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes". Erratum in Science 280(5371), 1821 (19 de junio de 1998).
2. Dal Porto, J, Johansen TE, Catipovic B, Parfiit DJ, Tuveson D, Gether U, Kozolowski S, Fearon DT, Schneck JP, PNAS USA 90(14), 6671-6675 (15 de julio de 1993), "A soluble divalent Class I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive T-cells at nanomolar concentrations".
3. Viola A. y Lanzavecchia A., APMIS 107(7), 615-623 (julio de 1999), "T-cell activation and the dynamic world of rafts".
4. Zhang W, Sommers CL, Burshtyn DN, Stebbins CC, DeJarnette JB, Tribble RP, Grinberg A, Tsay HC, Jacobs HM, Kessler CM, Long EO, Love PE y Samelson LE, Immunity 10(3), 323-332 (marzo de 1999), "Essential role of LAT in T-cell development".
5. Ugolini S y Vivier E., Curr. Opin. Immunol. 12(3), 295-300 (junio de 2000), "Regulation of T-cell function by NK cell receptors for classical MHC class I molecules".
6. Ljunggren HG, Stam NJ, Ohlen C, Neeffjes JJ, Hoglund P, Heemels MT, Bastin J, Schumacher TN, Townsend A, Karre K, et al., Nature 346(6283), 476-480 (2 de agosto de 1990), "Empty MHC class I molecules come out in the cold".
7. Coles MC, McMahon CW, Takizawa H, and Raulet DH., Eur. J. Immunol. 30(1), 236-244 (enero de 2000), "Memory CD8 T lymphocytes express inhibitory MHC-specific Ly49 receptors".
8. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL y Wiley DC., Nature 329(6139), 512-518 (8-14 October 1987), "The foreign antigen binding site and T-cell recognition regions of class I histocompatibility antigens".
9. Matsumura M, Fremont DH, Peterson PA, and Wilson IA, Science 257(5072), 927-934 (14 de agosto de 1992), "Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules".
10. Documento US 5.635.363 (Altman).
11. Marchand M, Weynants P, Rankin E, Arienti F, Belli F, Parmiani G, Cascinelli N, Burlond A, Vanwijck R, Humblet Y, et al., Int. J. Cancer 63(6),883-885 (11 de diciembre de 1995), "Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3".
12. "HLA: Genetic diversity of HLA. Functional and Medical Implication", Ed. Dominique Charron, EDK Press 1997.
13. "Molecular Cloning" (Sambrook, Fritsch y Maniatis), Cold Spring Harbor Press, 1989.

14. Merrifield RB, Stewart JM, et al., Anal. Chem. 38, 1905-1914 (1966), "Instrument for Automated Synthesis of Peptides".

15. Merrifield B., Science 232, 341-347 (1986), "Solid Phase Synthesis".

16. Barany G, Kneib-Cordonier N, et al., Int.. Peptide Protein Res. 30, 705-739 (1987), "Solid-phase peptide synthesis: A silver anniversary report".

17. Fields GB y Noble RL, Int. J. Peptide Protein Res. 35, 161-214 (1990), "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids".

18. Gordon EM, Barrett RW, et al., J. Med. Chem. 37(10), 1385-1401 (1994), "Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 2. Combinatorial Organic Synthesis, Library Screening Strategies, and future directions".

19. Houghten RA, Pinilla C, et al., Nature 354, 84-86 (1991), "Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery".

20. Jung G y Beck-Sickinger AG, Angew. Chem. Int. Engl. 31(4), 367-384 (1992), "Multiple Peptide Synthesis Methods and Their Applications".

21. Garboczi DN, Hung DT y Wiley DC, PNAS USA 8(8), 3429-3433 (15 de abril de 1992), "HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in Escherichia coli and complexed with single antigenic peptides".

22. Documento WO 93/01498 (A. Lihme y T. Boenisch, "Water soluble, polymer based reagents and conjugates comprising moieties derived from divinyl sulfone").

23. Larsson, Lars-Inge, "Immunocytochemistry: Theory and Practice", CRC Press inc., Boca Raton, Florida, (1988), Capítulo 3, página 77-146.

24. Kuttler, C., Nussbaum, A.K., Dick, T.P., Rammensee, H.-G., Schild, H., Haderer, K.P., An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages, J. Mol. Biol. 298 (2000), 417-429

25. Documento US 4.336.173

26. Documento EP 0 106 873 (Sintef)

27. Documento US 4.459.378

28. Documento US 4.654.267

29. Documento WO 99/11661

30. Documento WO 91/15766

31. Documento WO 2000/15665

Artículos:

1. Una construcción de moléculas MHC que comprende una molécula vehículo que tiene unida a la misma una o más moléculas MHC, estando dichas moléculas MHC fijadas a la molécula vehículo bien directamente o a través de una o más entidades de unión.

2. La construcción de molécula MHC de acuerdo con el artículo 1, en donde la molécula MHC es una molécula MHC de vertebrado tal como una molécula humana, una murina, una de rata, una porcina, una bovina o una aviar.

3. La construcción de molécula MHC de acuerdo con el artículo 1 o 2, en donde la molécula MHC es una molécula MHC humana.

4. La construcción de molécula MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-3, en donde la molécula MHC es una molécula MHC Clase I seleccionada del grupo que consiste en una cadena pesada, una cadena pesada combinada con una β_2m , una cadena pesada combinada un péptido y un dímero cadena pesada/ β_2m con un péptido; o una molécula MHC Clase II seleccionada del grupo que consiste en un dímero α/β , un dímero α/β con un péptido,

dímero α/β combinado mediante una etiqueta de afinidad y un dímero α/β combinado mediante una etiqueta de afinidad con un péptido;
o una molécula semejante a MHC Clase I o una molécula semejante a MHC Clase II.

- 5 5. La construcción de molécula MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-4, en donde la molécula MHC es una molécula MHC sin péptido.
6. La construcción de molécula MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-5, en donde al menos dos de las moléculas MHC son diferentes.
- 10 7. La construcción de molécula MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-5, en donde las moléculas MHC son las mismas.
- 15 8. La construcción de molécula MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-7, en donde al menos dos de los péptidos albergados por las moléculas MHC son diferentes.
9. La construcción de molécula MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-7, en donde los péptidos albergados por las moléculas MHC son los mismos.
- 20 10. La construcción de molécula MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-9, en donde las moléculas MHC están unidas a la molécula vehículo directamente.
11. La construcción de molécula MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-9, en donde las moléculas MHC están unidas a la molécula vehículo a través de una o más entidades de unión.
- 25 12. La construcción de molécula MHC de acuerdo con el artículo 11, en donde cada entidad de unión tiene unida a la misma de 1 a 10 moléculas MHC.
13. La construcción de molécula MHC de acuerdo con el artículo 11, en donde cada entidad de unión tiene unida a la misma de 1 a 8 moléculas MHC.
- 30 14. La construcción de molécula MHC de acuerdo con el artículo 11, en donde cada entidad de unión tiene unida a la misma de 1 a 6 moléculas MHC.
- 35 15. La construcción de molécula MHC de acuerdo con el artículo 11, en donde cada entidad de unión tiene unida a la misma de 1 a 4 moléculas MHC.
16. La construcción de molécula MHC de acuerdo con el artículo 11, en donde cada entidad de unión tiene unida a la misma de 1 a 3 moléculas MHC.
- 40 17. La construcción de molécula MHC de acuerdo con el artículo 11, en donde cada entidad de unión tiene unida a la misma 1 o 2 moléculas MHC.
- 45 18. La construcción de molécula MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-17, en donde el número total de moléculas MHC de la construcción es de 1 a 100.
19. La construcción de molécula MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-17, en donde el número total de moléculas MHC de la construcción es de 1 a 50.
- 50 20. La construcción de molécula MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-17, en donde el número total de moléculas MHC de la construcción es de 1 a 25.
21. La construcción de molécula MHC de acuerdo con el artículo 1, en donde la entidad de unión se selecciona de estreptavidina (SA) y avidina y derivados de las mismas, biotina, inmunoglobulinas, anticuerpos (monoclonal, policlonal, y recombinante), fragmentos de anticuerpo y derivados de los mismos, dominio de cremallera de leucina de AP-1 (jun y fos), hexa-his (resto de quelato de metal), hexa-hat GST (glutación S-transferasa) afinidad de glutatión, péptido de unión a calmodulina (CBP), Etiqueta Strep, Dominio de Unión a Celulosa, Proteína de Unión a Maltosa, Etiqueta S-Péptido, Etiqueta de Unión a Quitina, Epítopos Inmunoreactivos, Etiquetas de Epítipo, Etiqueta E2, Etiqueta de Epítipo HA, Epítipo Myc, Epítipo FLAG, Epítopos AU1 y AU5, Epítipo Glu-Glu, Epítipo KT3, Epítipo IRS, Epítipo Btag, Epítipo de proteína Quinasa C, Epítipo VSV, lecitinas que median la unión a una diversidad de compuestos, incluyendo carbohidratos, lípidos y proteínas, por ejemplo ConA (*Canavalia ensiformis*) o WGA (aglutinina de germen de trigo) y tetranectina o Proteína A o G (afinidad de anticuerpo).
- 55 22. La construcción de molécula MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-21, que comprende además una o más moléculas biológicamente activas.
- 60 65

23. La construcción de molécula MHC de acuerdo con el artículo 22, en donde las moléculas biológicamente activas se seleccionan de proteínas, moléculas co-estimuladoras, moléculas que modulan la célula, receptores, moléculas auxiliares, moléculas de adhesión, ligandos naturales, y moléculas tóxicas, así como anticuerpos y moléculas de unión recombinantes a las mismas, y combinaciones de las mismas.

24. La construcción de molécula MHC de acuerdo con los artículos 22 o 23, en donde la molécula biológicamente activa se une a la molécula vehículo bien directamente o a través de una o más entidades de unión.

25. La construcción de molécula MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 22-24, en donde la molécula biológicamente activa se selecciona de proteínas tales como proteínas semejantes a MHC Clase I como MIC A, MIC B, CD1d, HLA E, HLA F, HLA G, HLA H, ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3, moléculas co-estimuladoras tales como CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD9, CD27, CD28, CD30, CD69, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD147, CDw150 (SLAM), CD152 (CTLA-4), CD153 (CD30L), CD40L (CD154), NKG2D, ICOS, HVEM, HLA Clase II, PD-1, Fas (CD95), FasL expresado en células T y/o NK, CD40, CD48, CD58, CD70, CD72, B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), B7RP-1, B7-H3, PD-L1, PD-L2, CD134L, CD137L, ICOSL, LIGHT expresado en APC y/o células tumorales, moléculas que modulan células tales como CD16, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80, 2B4, KIR, LIR, CD94/NKG2A, CD94/NKG2C expresado en células NK, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, CSF (factores estimuladores de colonias), vitamina D3, toxinas IL-2, ciclosporina, FK-506, rapamicina, TGF-beta, clotrimazol, nitrendipina, y caribdotoxina, moléculas auxiliares tales como LFA-1, CD11a/18, CD54 (ICAM-1), CD106 (VCAM), y CD49a,b,c,d,e,f/CD29 (VLA-4), moléculas de adhesión tales como ICAM-1, ICAM-2, GlyCAM-1, CD34, anti-LFA-1, anti-CD44, anti-beta7, quimiocinas, CXCR4, CCR5, anti-selectina L, anti-selectina E, y anti-selectina P, moléculas tóxicas tales como ciclofosfamida, metotrexato, Azatioprina, mizoribina, 15-desoxuspergualina, neomicina, estaurosporina, genesteína, herbimicina A, exotoxina A de Pseudomonas, saporina, Rituxán, Ricina, gemtuzumab ozogamicina, toxina Shiga, metales pesados como mercuriales inorgánicos y orgánicos, y FN18-CRM9, radioisótopos tales como isótopos incorporados de yodo, cobalto, selenio, tritio y fósforo, y haptenos tales como DNP y digoxigenina, y anticuerpos de los mismos, o derivados de anticuerpos o fragmentos de los mismos y combinaciones de los mismos.

26. La construcción de molécula MHC de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-25 que comprende además uno o más compuestos de marcaje.

27. La construcción de molécula MHC de acuerdo con el artículo 26, en donde uno o más compuestos de marcaje están unidos a la molécula vehículo.

28. La construcción de molécula MHC de acuerdo con el artículo 26, en donde uno o más compuestos de marcaje están unidos a una o más de las entidades de unión.

29. La construcción de molécula MHC de acuerdo con el artículo 26, en donde uno o más compuestos de marcaje están unidos a una o más de las moléculas MHC.

30. La construcción de molécula MHC de acuerdo con el artículo 26, en donde uno o más compuestos de marcaje están unidos a la molécula vehículo y/o una o más de las entidades de unión y/o una o más de las moléculas MHC.

31. La construcción de molécula MHC de acuerdo con cualquiera de los artículos 26-30, en donde el compuesto de marcaje es directa o indirectamente detectable.

32. La construcción de molécula MHC de acuerdo con cualquiera de los artículos 26-31, en donde el compuesto de marcaje es un marcador fluorescente, un marcador enzimático, un radioisótopo, un marcador quimioluminiscente, un marcador bioluminiscente, un polímero, una partícula de metal, un hapteno, un anticuerpo, o un tinte.

33. La construcción de molécula MHC de acuerdo con cualquiera de los artículos 26-32, en donde el compuesto de marcaje se selecciona de marcadores fluorescentes tales como 5- (y 6)-carboxifluoresceína, 5- o 6-carboxifluoresceína, ácido 6-(fluorescein)-5-(y 6)-carboxamido hexanoico, isotiocianato de fluoresceína (F)TC), rodamina, tetrametilrodamina, y agentes de tinción tales como Cy2, Cy3, y Cy5, cumarina sustituida opcionalmente incluyendo AMCA, PerCP, ficobiliproteínas incluyendo R-ficoeritrina (RPE) y aloficoeritrina (APC), Rojo Texas, Rojo Princeton, proteína verde fluorescente (GFP) y análogos de la misma, y conjugados de R-ficoeritrina y aloficoeritrina y, por ejemplo, Cy5 o Rojo Texas, y marcadores fluorescentes inorgánicos basados en nanocristales semiconductores (como nanocristales quantum dot y Qdot™), y marcadores fluorescentes de tiempo resuelto basados en lantánidos como Eu3+ y Sm3+.

de haptenos tales como DNP, biotina, y digoxigenina o

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

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

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

34. La construcción de molécula MHC de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-33, en donde la molécula vehículo se selecciona de polisacáridos incluyendo dextranos, carboxi metil dextrano, dextrano polialdehído, carboximetil dextran lactona, y ciclodextrinas,

pululanos, esquizofilano, escleroglucano, xantano, gellan, O-etilamino guaran, quitinas y quitosanos incluyendo 6-O-carboximetil quitina y N-carboximetil quitosán,

celulósicos derivatizados incluyendo carboximetil celulosa, carboximetil hidroxietil celulosa, hidroxietil celulosa, 6-amino-6-desoxi celulosa y O-etil-amina celulosa,

almidón hidroxilado, hidroxipropil almidón, hidroxietil almidón, carragenanos, alginatos, y agarosa,

polisacáridos sintéticos incluyendo ficol y ficol carboximetilado,

polímeros de vinilo incluyendo poli(ácido acrílico), poli(acrilamidas), poli(ésteres acrílicos), poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido maleico), poli(anhídrido maleico), poli(acrilamida), poli(etil-co-vinil acetato), poli(ácido metacrílico), poli(vinil alcohol), poli(vinil alcohol-co-vinil cloroacetato), poli(vinil alcohol) aminado, y polímeros co bloque de los mismos,

poli etilen glicol (PEG) o polipropilen glicol o poli(óxido de etileno-co-óxidos de propileno) que contienen núcleos poliméricos incluyendo dendrímeros lineales, en forma de peine o StarBurst™,

poliaminoácidos incluyendo polilisinas, ácido poliglutámico, poliuretanos, poli(etilen iminas), pluriol,

proteínas incluyendo albúminas, inmunoglobulinas, y proteínas semejantes a virus (VLP), y

polinucleótidos, ADN, PNA, LNA, oligonucleótidos y construcciones de dendrímeros de oligonucleótidos.

35. La construcción de molécula MHC de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-34, en donde la molécula vehículo es una molécula vehículo soluble.

36. La construcción de molécula MHC de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-35 en forma soluble.

37. La construcción de molécula MHC de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-36 inmovilizada sobre un soporte sólido o semisólido.

38. La construcción de molécula MHC de acuerdo con el artículo 37, inmovilizada directamente al soporte sólido o semisólido.

39. La construcción de molécula MHC de acuerdo con el artículo 37, inmovilizada al soporte sólido o semisólido a través de un conector, un espaciador o un anticuerpo, un derivado de anticuerpo o un fragmento de los mismos.

40. La construcción de molécula MHC de acuerdo con cualquiera de los artículos 37-39, en donde el soporte se selecciona de partículas, perlas, partículas biodegradables, láminas, geles, filtros, membranas (por ejemplo, membranas de nilón), fibras, capilares, agujas, tiras de microtitulación, tubos, placas o pocillos, peines, puntas de pipeta, micro matrices y chips.

41. La construcción de molécula MHC de acuerdo con el artículo 40, en donde el soporte se selecciona de perlas y partículas.

42. La construcción de molécula MHC de acuerdo con el artículo 41, en donde las perlas y las partículas son perlas poliméricas, partículas poliméricas, perlas magnéticas, partículas magnéticas, perlas supermagnéticas o partículas supermagnéticas.

43. La construcción de molécula MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-42 para su uso en un método de citometría de flujo.

44. La construcción de molécula MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-42 para su uso en un método histológico.

45. La construcción de molécula MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-42 para su uso en un método citológico.

46. Un método para detectar la presencia de células que reconocen MHC en una muestra que comprende las etapas de

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

- (b) poner en contacto la muestra con una construcción de moléculas MHC de acuerdo con los artículos 1-42 y
- (c) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, cuya unión indica la presencia de células que reconocen MHC.

47. Un método para monitorizar células que reconocen MHC que comprende las etapas de

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC,
- (b) poner en contacto la muestra con una construcción de moléculas MHC de acuerdo con los artículos 1-42 y
- (c) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, monitorizando así células que reconocen MHC.

48. Un método para establecer un pronóstico de una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC,
- (b) poner en contacto la muestra con una construcción de moléculas MHC de acuerdo con los artículos 1-42 y
- (c) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, estableciendo así un pronóstico de una enfermedad que implica células que reconocen MHC.

49. Un método para determinar el estado de una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC,
- (b) poner en contacto la muestra con una construcción de moléculas MHC de acuerdo con los artículos 1-42 y
- (c) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, determinando así el estado de una enfermedad que implica células que reconocen MHC.

50. Un método para diagnosticar una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC,
- (b) poner en contacto la muestra con una construcción de moléculas MHC de acuerdo con los artículos 1-42 y
- (c) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, diagnosticando así una enfermedad que implica células que reconocen MHC.

51. Un método para determinar la eficacia de un medicamento contra una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC,
- (b) poner en contacto la muestra con una construcción de moléculas MHC de acuerdo con los artículos 1-42 y
- (c) determinar cualquier unión de la construcción de moléculas MHC, determinando así la eficacia del medicamento.

52. El método de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 46-51, en donde las células que reconocen MHC están implicadas en una enfermedad de origen inflamatorio, autoinmune, alérgico, vírico, canceroso, infeccioso, alo o xenogénico (injerto frente a hospedador y hospedador frente a injerto).

53. El método de acuerdo con el artículo 52, en donde la enfermedad es una enfermedad inflamatoria crónica del intestino tales como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, esclerosis, diabetes tipo I, artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis atópica, asma, melanoma maligno, carcinoma renal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer del útero, cáncer cervical, cáncer prostático, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, linfoma cutáneo, carcinoma hepático, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, enfermedad relacionada con el rechazo, enfermedad relacionada con injerto frente a hospedador, o una enfermedad vírica asociada a hepatitis, SIDA, sarampión, viruela, varicela, rubeola o herpes.

54. El método de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 46-53, en donde las células que reconocen MHC se seleccionan de subpoblaciones de células T CD3+, células T gamma, delta, células T alfa, beta, células T CD4+, células T auxiliares, células T CD8+, células T supresoras, células T citotóxicas CD8+, CTL, células NK, células NKT, células LAK, y MAK.

55. El método de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 46-51, en donde la muestra se selecciona de material histológico, material citológico, tumores primarios, metástasis orgánicas secundarias, aspirados con aguja fina, tejido del bazo, muestras de médula ósea, extensiones celulares, muestras citológicas exfoliativas, preparaciones por impronta, frotis orales, frotis laríngeos, frotis vaginales, lavado bronquial, lavado gástrico, del cordón umbilical, y de fluidos corporales tales como sangre (por ejemplo, de una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de la sangre o de otras preparaciones derivadas de la sangre tales como productos de

leucoféresis), de muestras de esputo, expectorados, y aspirados bronquiales.

56. El método de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 46-55, en donde la determinación de la unión se lleva a cabo por inspección en un microscopio, por luz, por fluorescencia, por transmisión de electrones o por citometría de flujo.

57. El método de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 46-56, en donde la muestra se monta en un soporte.

58. El método de acuerdo con el artículo 57, en donde el soporte es un soporte sólido o semisólido.

59. El método de acuerdo con el artículo 57 o 58, en donde el soporte se selecciona de portaobjetos de vidrio, placas de microtitulación que tienen uno o más pocillos, perlas, partículas, membranas, filtros, membranas de filtro, portaobjetos de polímero, membranas de polímero, portaobjetos de cámara, placas y placas Petri.

60. Una composición que comprende una construcción de moléculas MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-42 en un medio solubilizante.

61. La composición de acuerdo con el artículo 60, en donde la construcción de moléculas MHC comprende moléculas MHC cargadas con péptido.

62. La composición de acuerdo con el artículo 60, en donde la construcción de moléculas MHC comprende moléculas MHC sin péptido.

63. La composición de acuerdo con el artículo 62, en donde los péptidos para cargar las moléculas MHC sin péptido y la construcción de moléculas MHC que comprende moléculas sin péptido se proporciona separadamente.

64. Una composición que comprende una construcción de moléculas MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-42, en donde la construcción de molécula MHC se inmoviliza sobre un soporte sólido o semisólido.

65. La composición de acuerdo con el artículo 64, en donde el soporte se selecciona de portaobjetos de vidrio, placas de microtitulación que tienen uno o más pocillos, perlas, partículas, membranas, filtros, membranas de filtro, portaobjetos de polímero, membranas de polímero, portaobjetos de cámara, placas y placas Petri.

66. La composición de acuerdo con el artículo 64 o 65, en donde las perlas y las partículas son perlas poliméricas, partículas poliméricas, perlas magnéticas, partículas magnéticas, perlas supermagnéticas o partículas supermagnéticas.

67. La composición de acuerdo con el artículo 64, en donde la construcción de moléculas MHC comprende moléculas MHC cargadas con péptido.

68. La composición de acuerdo con el artículo 64, en donde la construcción de moléculas MHC comprende moléculas MHC sin péptido.

69. La composición de acuerdo con el artículo 68, en donde los péptidos para cargar las moléculas MHC sin péptido y la construcción de moléculas MHC que comprende moléculas sin péptido se proporciona separadamente.

70. Uso de una construcción de moléculas MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-42 como un sistema de detección.

71. Uso de una construcción de moléculas MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-42 para diagnosticar una enfermedad que implica células que reconocen MHC.

72. Uso de una construcción de moléculas MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-42 para monitorizar una enfermedad que implica células que reconocen MHC.

73. Uso de una construcción de moléculas MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-42 para establecer un pronóstico para una enfermedad que implica células que reconocen MHC.

74. Uso de una construcción de moléculas MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-42 para determinar el estado de una enfermedad que implica células que reconocen MHC.

75. Uso de una construcción de moléculas MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-42 para determinar la eficacia de un medicamento contra una enfermedad que implica células que reconocen MHC.

76. Uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 71, en donde las células que reconocen MHC están implicadas en una enfermedad de origen inflamatorio, autoinmune, alérgico, vírico, canceroso, infeccioso, alo o

xenogénico (injerto frente a hospedador y hospedador frente a injerto).

77. Uso de acuerdo con el artículo 76, en donde la enfermedad es una enfermedad inflamatoria crónica del intestino tales como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, esclerosis, diabetes tipo I, artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis atópica, asma, melanoma maligno, carcinoma renal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer del útero, cáncer cervical, cáncer prostático, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, linfoma cutáneo, carcinoma hepático, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, enfermedad relacionada con el rechazo, enfermedad relacionada con injerto frente a hospedador, o una enfermedad vírica asociada a hepatitis, SIDA, sarampión, viruela, varicela, rubeola o herpes.

78. Uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 70-77, en donde las células que reconocen MHC se seleccionan de subpoblaciones de células T CD3+, células T gamma, delta, células T alfa, beta, células T CD4+, células T auxiliares, células T CD8+, células T supresoras, células T citotóxicas CD8+, CTL, células NK, células NKT, células LAK, y MAK.

79. La construcción de moléculas MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-42 para su uso como una composición terapéutica.

80. La construcción de moléculas MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-42 para su uso en terapia *in vivo*.

81. La construcción de moléculas MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-42 para su uso en terapia *ex vivo*.

82. Una composición terapéutica que comprende como principio activo una construcción de moléculas MHC como se define en uno cualquiera de los artículos 1-42.

83. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 82, en donde la construcción de moléculas MHC está inmovilizada en un soporte sólido o semisólido biodegradable.

84. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 82 u 83, en donde la construcción de moléculas MHC comprende una molécula vehículo que tiene unida a la misma una o más moléculas MHC, estando dichas moléculas MHC fijadas a la molécula vehículo bien directamente o a través de una o más entidades de unión.

85. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 82 u 83, en donde la molécula MHC es una molécula MHC de vertebrado tal como una molécula humana, una murina, una de rata, una porcina, una bovina o una aviar.

86. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-85, en donde la molécula MHC es una molécula MHC humana.

87. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-86, en donde la molécula MHC es una molécula MHC Clase I seleccionada del grupo que consiste en una cadena pesada, una cadena pesada combinada con una β_2m , una cadena pesada combinada un péptido y un dímero cadena pesada/ β_2m con un péptido; o una molécula MHC Clase II seleccionada del grupo que consiste en un dímero α/β , un dímero α/β con un péptido, dímero α/β combinado mediante una etiqueta de afinidad y un dímero α/β combinado mediante una etiqueta de afinidad con un péptido; o una molécula semejante a MHC Clase I o una molécula semejante a MHC Clase II.

88. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-87, en donde la molécula MHC es una molécula MHC sin péptido.

89. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-88, en donde al menos dos de las moléculas MHC son diferentes.

90. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-88, en donde las moléculas MHC son las mismas.

91. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-88, en donde al menos dos de los péptidos albergados por las moléculas MHC son diferentes.

92. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-88, en donde los péptidos albergados por las moléculas MHC son los mismos.

93. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-92, en donde las moléculas

MHC están unidas a la molécula vehículo directamente.

94. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-92, en donde las moléculas MHC están unidas a la molécula vehículo a través de una o más entidades de unión.

95. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 94, en donde cada entidad de unión tiene unida a la misma de 1 a 10 moléculas MHC.

96. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 94, en donde cada entidad de unión tiene unida a la misma de 1 a 8 moléculas MHC.

97. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 94, en donde cada entidad de unión tiene unida a la misma de 1 a 6 moléculas MHC.

98. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 94, en donde cada entidad de unión tiene unida a la misma de 1 a 4 moléculas MHC.

99. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 94, en donde cada entidad de unión tiene unida a la misma de 1 a 3 moléculas MHC.

100. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 94, en donde cada entidad de unión tiene unida a la misma 1 o 2 moléculas MHC.

101. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-100, en donde el número total de moléculas MHC de la construcción es de 1 a 100.

102. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-100, en donde el número total de moléculas MHC de la construcción es de 1 a 50.

103. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-100, en donde el número total de moléculas MHC de la construcción es de 1 a 25.

104. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 94, en donde la entidad de unión se selecciona de estreptavidina (SA) y avidina y derivados de las mismas, biotina, inmunoglobulinas, anticuerpos (monoclonal, policlonal, y recombinante), fragmentos de anticuerpo y derivados de los mismos, dominio de cremallera de leucina de AP-1 (jun y fos), hexa-his (resto de quelato de metal), hexa-hat GST (glutación S-transferasa) afinidad de glutatión, péptido de unión a calmodulina (CBP), Etiqueta Strep, Dominio de Unión a Celulosa, Proteína de Unión a Maltosa, Etiqueta S-Péptido, Etiqueta de Unión a Quitina, Epítopos Inmunoreactivos, Etiquetas de Epítopo, Etiqueta E2, Etiqueta de Epítopo HA, Epítopo Myc, Epítopo FLAG, Epítopos AU1 y AU5, Epítopo Glu-Glu, Epítopo KT3, Epítopo IRS, Epítopo Btag, Epítopo de proteína Quinasa C, Epítopo VSV, lecitinas que median la unión a una diversidad de compuestos, incluyendo carbohidratos, lípidos y proteínas, por ejemplo ConA (*Canavalia ensiformis*) o WGA (aglutinina de germen de trigo) y tetranectina o Proteína A o G (afinidad de anticuerpo).

105. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-104 que comprende además una o más moléculas biológicamente activas.

106. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 105, en donde las moléculas biológicamente activas se seleccionan de proteínas, moléculas co-estimuladoras, moléculas que modulan la célula, receptores, moléculas auxiliares, moléculas de adhesión, ligandos naturales, y moléculas tóxicas, y como anticuerpos y moléculas de unión recombinantes a las mismas, y combinaciones de las mismas.

107. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 105 o 106, en donde la molécula biológicamente activa se une a la molécula vehículo bien directamente o a través de una o más entidades de unión.

108. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 105-107, en donde la molécula biológicamente activa se selecciona de proteínas tales como proteínas semejantes a MHC Clase I como MIC A, MIC B, CD1d, HLA E, HLA F, HLA G, HLA H, ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3, moléculas co-estimuladoras tales como CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD9, CD27, CD28, CD30, CD69, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD147, CDw150 (SLAM), CD152 (CTLA-4), CD153 (CD30L), CD40L (CD154), NKG2D, ICOS, HVEM, HLA Clase II, PD-1, Fas (CD95), FasL expresado en células T y/o NK, CD40, CD48, CD58, CD70, CD72, B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), B7RP-1, B7-H3, PD-L1, PD-L2, CD134L, CD137L, ICOSL, LIGHT expresado en APC y/o células tumorales, moléculas que modulan células tales como CD16, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80, 2B4, KIR, LIR, CD94/NKG2A, CD94/NKG2C expresado en células NK, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, CSF (factores estimuladores de colonias), vitamina D3, toxinas IL-2, ciclosporina, FK-506,

rapamicina, TGF-beta, clotrimazol, nitrendipina, y caribdotoxina, moléculas auxiliares tales como LFA-1, CD11a/18, CD54 (ICAM-1), CD106 (VCAM), y CD49a,b,c,d,e,f/CD29 (VLA-4),
 5 moléculas de adhesión tales como ICAM-1, ICAM-2, GlyCAM-1, CD34, anti-LFA-1, anti-CD44, anti-beta7, quimiocinas, CXCR4, CCR5, anti-selectina L, anti-selectina E, y anti-selectina P, moléculas tóxicas tales como ciclofosfamida, metotrexato, Azatioprina, mizoribina, 15-desoxuspergualina, neomicina, estaurosporina, genesteína, herbimicina A, exotoxina A de Pseudomonas, saporina, Rituxán, Ricina, gentuzumab ozogamicina, toxina Shiga, metales pesados como mercuriales inorgánicos y orgánicos, y FN18-CRM9, radioisótopos tales como isótopos incorporados de yodo, cobalto, selenio, tritio y fósforo, y haptenos tales
 10 como DNP y digoxigenina, y anticuerpos de los mismos, o derivados de anticuerpos o fragmentos de los mismos y combinaciones de los mismos.

109. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-108, en donde la molécula vehículo se selecciona de polisacáridos incluyendo dextranos, carboxi metil dextrano, dextrano polialdehído, carboximetil dextran lactona, y ciclodextrinas,
 15 pululanos, esquizofilano, escleroglucano, xantano, gellan, O-etilamino guaran, quitinas y quitosanos incluyendo 6-O-carboximetil quitina y N-carboximetil quitosán, celulósicos derivatizados incluyendo carboximetil celulosa, carboximetil hidroxietil celulosa, hidroxietil celulosa, 6-amino-6-desoxi celulosa y O-etil-amina celulosa, almidón hidroxilado, hidroxipropil almidón, hidroxietil almidón, carragenanos, alginatos, y agarosa, polisacáridos sintéticos incluyendo ficol y ficol carboximetilado, polímeros de vinilo incluyendo poli(ácido acrílico), poli(acrilamidas), poli(ésteres acrílicos), poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido maleico), poli(anhídrido maleico), poli(acrilamida), poli(etil-co-vinil acetato), poli(ácido metacrílico), poli(vinil alcohol), poli(vinil alcohol-co-vinil cloroacetato), poli(vinil alcohol)
 20 aminado, y polímeros co bloque de los mismos, poli etilen glicol (PEG) o polipropilen glicol o poli(óxido de etileno-co-óxidos de propileno) que contienen núcleos poliméricos incluyendo dendrímeros lineales, en forma de peine o StarBurst™, poliaminoácidos incluyendo polilisinas, ácido poliglutámico, poliuretanos, poli(etilen iminas), pluriol, proteínas incluyendo albúminas, inmunoglobulinas, y proteínas semejantes a virus (VLP), y polinucleótidos, ADN, PNA, LNA, oligonucleótidos y construcciones de dendrímeros de oligonucleótidos.

110. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-109, en donde la molécula vehículo es una molécula vehículo soluble.

111. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-110 que comprende además uno o más adyuvantes y/o excipientes.

112. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 111, en donde el adyuvante se selecciona de saponinas tales como Quil A y Qs-21, emulsiones aceite en agua tales como MF59, MPL, PLG, PLGA, sales de aluminio, fosfato de calcio, emulsiones agua en aceite tales como IFA (adyuvante incompleto de Freund) y CFA (adyuvante completo de Freund), interleucinas tales como IL-1β, IL-2, IL-7, IL-12, e INFγ, Adju-Phos®, glucano, formulación de antígeno, micropartículas biodegradables, Holotoxina del Cólera, liposomas, DDE, DHEA, DMPC, DMPG, Complejo DOC/Alúmina, ISCOMs®, muramil dipéptido, monofosforil lípido A, muramil tripéptido, y fosfatidiletanolamina. En una realización preferida de la presente divulgación, el adyuvante se selecciona de saponinas tales como Quil A y Qs-21, MF59, MPL, PLG, PLGA, fosfato de calcio, y sales de aluminio.

113. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 113, en donde el excipiente se selecciona de diluyentes, tampones, agentes de suspensión, agentes humectantes, agentes solubilizantes, agentes ajustadores del pH, agentes dispersantes, agentes conservantes, y/o colorantes.

114. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-113 para el tratamiento, la prevención, la estabilización o el alivio de enfermedades que implican células de reconocimiento de MHC.

115. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 114, en donde las células de reconocimiento de MHC están implicadas en una enfermedad de origen inflamatorio, autoinmune, alérgico, vírico, canceroso, infeccioso, alo o xenogénico (injerto frente a hospedador y hospedador frente a injerto).

116. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 115, en donde la enfermedad es una enfermedad inflamatoria crónica del intestino tales como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, esclerosis, diabetes tipo I, artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis atópica, asma, melanoma maligno, carcinoma renal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer del útero, cáncer cervical, cáncer prostático, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, linfoma cutáneo, carcinoma hepático, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, enfermedad relacionada con el rechazo, enfermedad relacionada con injerto frente a hospedador, o una enfermedad vírica asociada a hepatitis, SIDA, sarampión, viruela, varicela, rubeola o herpes.

117. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-116 formulada para administración parenteral, incluyendo administración intravenosa, intramuscular, intraarticular, subcutánea, intradérmica, epicutánea/transdérmica, e intraperitoneal, para infusión, para administración oral, para administración nasal, para administración rectal, o para administración tópica.

118. Una composición terapéutica que comprende como principio activo una cantidad eficaz de células que reconocen MHC, obteniéndose las células que reconocen MHC poniendo en contacto una muestra de un sujeto que comprende células que reconocen MHC con una construcción de moléculas MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-42, mediante lo cual las células que reconocen MHC se vuelven unidas a la construcción de moléculas MHC, aislar la construcción de moléculas MHC y las células que reconocen MHC unidas y expandir dichas células que reconocen MHC hasta un número clínicamente relevante.

119. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 118, en donde las células que reconocen MHC aisladas se liberan de la construcción de moléculas MHC antes de la expansión.

120. La composición terapéutica de acuerdo con los artículos 118 o 119, en donde la construcción de moléculas MHC se inmoviliza sobre un soporte sólido o semisólido.

121. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 120, en donde la construcción de moléculas MHC se inmoviliza sobre el soporte sólido o semisólido antes del contacto con la muestra.

122. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 120, en donde la construcción de moléculas MHC se inmoviliza sobre el soporte sólido o semisólido después del contacto con la muestra.

123. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-122, en donde la expansión se lleva a cabo en presencia de una o más construcciones de moléculas MHC, opcionalmente una o más moléculas biológicamente activas y opcionalmente células alimentadoras tales como células dendríticas o células alimentadoras.

124. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 120-123, en donde la construcción de moléculas MHC se inmoviliza sobre el soporte sólido o semisólido directamente.

125. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 120-124, en donde la construcción de moléculas MHC se inmoviliza al soporte sólido o semisólido a través de un conector, un espaciador o un anticuerpo, un derivado de anticuerpo o un fragmento de los mismos.

126. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 120-125, en donde el soporte sólido o semisólido se selecciona de partículas, perlas, partículas biodegradables, láminas, geles, filtros, membranas, fibras, capilares, agujas, tiras de microtitulación, tubos, placas o pocillos, peines, puntas de pipeta, micro matrices, chips y placas de microtitulación que tienen uno o más pocillos.

127. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 120-126, en donde el soporte sólido se selecciona de partículas y perlas.

128. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 127, en donde las perlas y las partículas son poliméricas, magnéticas o supermagnéticas.

129. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-128, en donde el aislamiento se realiza aplicando un campo magnético o mediante citometría de flujo.

130. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-128, en donde la construcción de moléculas MHC comprende una molécula vehículo que tiene unida a la misma una o más moléculas MHC, estando dichas moléculas MHC fijadas a la molécula vehículo bien directamente o a través de una o más entidades de unión.

131. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-130, en donde la molécula MHC es una molécula MHC de vertebrado tal como una molécula humana, una murina, una de rata, una porcina, una bovina o una aviar.

132. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-131, en donde la molécula MHC es una molécula MHC humana.

133. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-132, en donde la molécula MHC es una molécula MHC Clase I seleccionada del grupo que consiste en una cadena pesada, una cadena pesada

combinada con una β_2m , una cadena pesada combinada un péptido y un dímero cadena pesada/ β_2m con un péptido;
o una molécula MHC Clase II seleccionada del grupo que consiste en un dímero α/β , un dímero α/β con un péptido,
5 dímero α/β combinado mediante una etiqueta de afinidad y un dímero α/β combinado mediante una etiqueta de afinidad con un péptido;
o una molécula semejante a MHC Clase I o una molécula semejante a MHC Clase II.

134. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-133, en donde la molécula MHC es una molécula MHC sin péptido.

135. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-134, en donde al menos dos de las moléculas MHC son diferentes.

136. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-135, en donde las moléculas MHC son las mismas.

137. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-136, en donde al menos dos de los péptidos albergados por las moléculas MHC son diferentes.

138. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-137, en donde los péptidos albergados por las moléculas MHC son los mismos.

139. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-138, en donde las moléculas MHC están unidas a la molécula vehículo directamente.

140. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-138, en donde las moléculas MHC están unidas a la molécula vehículo a través de una o más entidades de unión.

141. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 140, en donde cada entidad de unión tiene unida a la misma de 1 a 10 moléculas MHC.

142. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 140, en donde cada entidad de unión tiene unida a la misma de 1 a 8 moléculas MHC.

143. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 140, en donde cada entidad de unión tiene unida a la misma de 1 a 6 moléculas MHC.

144. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 140, en donde cada entidad de unión tiene unida a la misma de 1 a 4 moléculas MHC.

145. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 140, en donde cada entidad de unión tiene unida a la misma de 1 a 3 moléculas MHC.

146. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 140, en donde cada entidad de unión tiene unida a la misma 1 o 2 moléculas MHC.

147. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-146, en donde el número total de moléculas MHC de la construcción es de 1 a 100.

148. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-146, en donde el número total de moléculas MHC de la construcción es de 1 a 50.

149. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-146, en donde el número total de moléculas MHC de la construcción es de 1 a 25.

150. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 140, en donde la entidad de unión se selecciona de estreptavidina (SA) y avidina y derivados de las mismas, biotina, inmunoglobulinas, anticuerpos (monoclonal, policlonal, y recombinante), fragmentos de anticuerpo y derivados de los mismos, dominio de cremallera de leucina de AP-1 (jun y fos), hexa-his (resto de quelato de metal), hexa-hat GST (glutación S-transferasa) afinidad de glutación, péptido de unión a calmodulina (CBP), Etiqueta Strep, Dominio de Unión a Celulosa, Proteína de Unión a Maltosa, Etiqueta S-Péptido, Etiqueta de Unión a Quitina, Epítopos Inmunoreactivos, Etiquetas de Epítopo, Etiqueta E2, Etiqueta de Epítopo HA, Epítopo Myc, Epítopo FLAG, Epítopos AU1 y AU5, Epítopo Glu-Glu, Epítopo KT3, Epítopo IRS, Epítopo Btag, Epítopo de proteína Quinasa C, Epítopo VSV, lecitinas que median la unión a una diversidad de compuestos, incluyendo carbohidratos, lípidos y proteínas, por ejemplo ConA (*Canavalia ensiformis*) o WGA (aglutinina de germen de trigo) y tetranectina o Proteína A o G (afinidad de anticuerpo).

151. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-150 que comprende además una o más moléculas biológicamente activas.

152. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 151, en donde las moléculas biológicamente activas se seleccionan de proteínas, moléculas co-estimuladoras, moléculas que modulan la célula, receptores, moléculas auxiliares, moléculas de adhesión, ligandos naturales, y moléculas tóxicas, y anticuerpos y moléculas de unión recombinantes a las mismas, y combinaciones de las mismas.

153. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 150 o 151, en donde la molécula biológicamente activa se une a la molécula vehículo bien directamente o a través de una o más entidades de unión.

154. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 151-153, en donde la molécula biológicamente activa se selecciona de

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

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

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

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

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

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

y anticuerpos de los mismos, o derivados de anticuerpos o fragmentos de los mismos y combinaciones de los mismos.

155. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-154, en donde la molécula vehículo se selecciona de polisacáridos incluyendo dextranos, carboxi metil dextrano, dextrano polialdehído, carboximetil dextran lactona, y ciclodextrinas,

pululanos, esquizofilano, escleroglucano, xantano, gellan, O-etilamino guaran, quitinas y quitosanos incluyendo 6-O-carboximetil quitina y N-carboximetil quitosán,

celulósicos derivatizados incluyendo carboximetil celulosa, carboximetil hidroxietil celulosa, hidroxietil celulosa, 6-amino-6-desoxi celulosa y O-etil-amina celulosa,

almidón hidroxilado, hidroxipropil almidón, hidroxietil almidón, carragenanos, alginatos, y agarosa,

polisacáridos sintéticos incluyendo ficol y ficol carboximetilado,

polímeros de vinilo incluyendo poli(ácido acrílico), poli(acrilamidas), poli(ésteres acrílicos), poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido maleico), poli(anhídrido maleico), poli(acrilamida), poli(etil-co-vinil acetato), poli(ácido metacrílico), poli(vinil alcohol), poli(vinil alcohol-co-vinil cloroacetato), poli(vinil alcohol) aminado, y polímeros co bloque de los mismos,

poli etilen glicol (PEG) o polipropilen glicol o poli(óxido de etileno-co-óxidos de propileno) que contienen núcleos poliméricos incluyendo dendrímeros lineales, en forma de peine o StarBurst™,

poliaminoácidos incluyendo polilisinas, ácido poliglutámico, poliuretanos, poli(etilen iminas), pluriol.

proteínas incluyendo albúminas, inmunoglobulinas, y proteínas semejantes a virus (VLP), y

polinucleótidos, ADN, PNA, LNA, oligonucleótidos y construcciones de dendrímeros de oligonucleótidos.

156. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-155 que comprende además uno o más compuestos de marcaje.

157. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 156, en donde uno o más compuestos de marcaje están unidos a la molécula vehículo.

158. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 156, en donde uno o más compuestos de marcaje están unidos a una o más de las entidades de unión.

159. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 156, en donde uno o más compuestos de marcaje están unidos a una o más de las moléculas MHC.

160. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 156, en donde uno o más compuestos de marcaje están unidos a la molécula vehículo y/o una o más de las entidades de unión y/o una o más de las moléculas MHC.

161. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 156-160, en donde el compuesto de marcaje es directa o indirectamente detectable.

162. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 156-161, en donde el compuesto de marcaje es un marcador fluorescente, un marcador enzimático, un radioisótopo, un marcador quimioluminiscente, un marcador bioluminiscente, un polímero, una partícula de metal, un hapteno, un anticuerpo, o un tinte.

163. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 156-162, en donde el compuesto de marcaje

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

de haptenos tales como DNP, biotina, y digoxigenina o

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

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

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

164. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-163, en donde la molécula vehículo es una molécula vehículo soluble.

165. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-164 que comprende además uno o más excipientes.

166. La composición terapéutica de acuerdo con los artículos 165, en donde el excipiente se selecciona de diluyentes, tampones, agentes de suspensión, agentes humectantes, agentes solubilizantes, agentes ajustadores del pH, agentes dispersantes, agentes conservantes, y/o colorantes.

167. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-166 para el tratamiento, la prevención, la estabilización o el alivio de enfermedades que implican células de reconocimiento de MHC.

168. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 167, en donde las células de reconocimiento de MHC están implicadas en una enfermedad de origen inflamatorio, autoinmune, alérgico, vírico, canceroso, infeccioso, alo o xenogénico (injerto frente a hospedador y hospedador frente a injerto).

169. La composición terapéutica de acuerdo con el artículo 167 o 168, en donde la enfermedad es una enfermedad inflamatoria crónica del intestino tales como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, esclerosis, diabetes tipo I, artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis atópica, asma, melanoma maligno, carcinoma renal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer del útero, cáncer cervical, cáncer prostático, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, linfoma cutáneo, carcinoma hepático, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, enfermedad relacionada con el rechazo, enfermedad relacionada con injerto frente a hospedador, o una enfermedad vírica asociada a hepatitis, SIDA, sarampión, viruela, varicela, rubeola o herpes.

170. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-169 formulada para administración parenteral, incluyendo administración intravenosa, intramuscular, intraarticular, subcutánea, intradérmica, epicutánea/transdérmica, e intraperitoneal, para infusión, para administración oral, para administración nasal, para administración rectal, o para administración tópica.

171. La composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-170 para su uso en terapia *in vivo*.

172. Un método para tratar un animal, incluyendo un ser humano, que comprende administrar una composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-170 en una cantidad eficaz.

173. Un método para regular positivamente, regular negativamente, modular una respuesta inmune en un animal, incluyendo un ser humano, que comprende administrar una composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-170 en una cantidad eficaz.

174. Un método para inducir anergia de una célula en un animal, incluyendo un ser humano, que comprende administrar una composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-170 en una cantidad eficaz.

175. Un método inmunoterapéutico celular adoptivo que comprende administrar a un animal, incluyendo un ser humano, una composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-170.

176. Un método para obtener células que reconocen MHC que comprende poner en contacto una construcción de moléculas MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-42 y una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC en condiciones por las que las células que reconocen MHC se unen a la construcción de moléculas MHC y aislar la construcción de moléculas MHC y las células que reconocen MHC unidas.

177. El método de acuerdo con el artículo 176, en donde el aislamiento se lleva a cabo aplicando un campo magnético o por citometría.

178. Un método para producir una composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 82-170, que comprende proporcionar una construcción de moléculas MHC como se define en los artículos 1-42, solubilizar o dispersar la construcción de moléculas MHC en un medio adecuado para sustancias terapéuticas y opcionalmente añadir otros adyuvantes y/o excipientes.

179. Un método para producir una composición terapéutica de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 118-170, que comprende obtener células que reconocen MHC usando una construcción de moléculas MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-42, expandir dichas células que reconocen MHC hasta un número clínicamente relevante, formular las células obtenidas en un medio adecuado para administración, y opcionalmente añadir adyuvantes y/o excipientes.

180. Uso de una construcción de moléculas MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-42 para la expansión *ex vivo* de células que reconocen MHC.

181. Uso de acuerdo con el artículo 180, en donde la construcción de molécula MHC está en forma soluble.

182. Uso de acuerdo con el artículo 180, en donde la construcción de molécula MHC está inmovilizada sobre un soporte sólido o semisólido.

183. Uso de acuerdo con el artículo 182, en donde el soporte sólido o semisólido se selecciona de partículas, perlas, partículas biodegradables, láminas, geles, filtros, membranas (por ejemplo, membranas de nilón), fibras, capilares, agujas, tiras de microtitulación, tubos, placas o pocillos, peines, puntas de pipeta, micro matrices, chips y portaobjetos.

184. Uso de acuerdo con el artículo 182 o 183, en donde el soporte sólido o semisólido se selecciona de perlas y partículas.

185. Uso de acuerdo con el artículo 184, en donde el soporte sólido o semisólido se selecciona de partículas y perlas poliméricas, magnéticas o superparamagnéticas.

186. Uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 180-185, en donde la construcción de moléculas MHC también comprende una o más moléculas biológicamente activas.

187. Uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 180-186, en donde la molécula biológicamente activa se selecciona de proteínas tales como proteínas semejantes a MHC Clase I como MIC A, MIC B, CD1d, HLA E, HLA F, HLA G, HLA H, ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3, moléculas co-estimuladoras tales como CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD9, CD27, CD28, CD30, CD69, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD147, CDw150 (SLAM), CD152 (CTLA-4), CD153 (CD30L), CD40L (CD154), NKG2D, ICOS, HVEM, HLA Clase II, PD-1, Fas (CD95), FasL expresado en células T y/o NK, CD40, CD48, CD58, CD70, CD72, B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), B7RP-1, B7-H3, PD-L1, PD-L2, CD134L, CD137L, ICOSL, LIGHT expresado en APC y/o células tumorales,

moléculas que modulan células tales como CD16, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80, 2B4, KIR, LIR, CD94/NKG2A,

CD94/NKG2C expresado en células NK, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, CSF (factores estimuladores de colonias), vitamina D3, toxinas IL-2, ciclosporina, FK-506, rapamicina, TGF-beta, clotrimazol, nitrendipina, y caribdotoxina, moléculas auxiliares tales como LFA-1, CD11a/18, CD54 (ICAM-1), CD106 (VCAM), y CD49a,b,c,d,e,f/CD29 (VLA-4), moléculas de adhesión tales como ICAM-1, ICAM-2, GlyCAM-1, CD34, anti-LFA-1, anti-CD44, anti-beta7, quimiocinas, CXCR4, CCR5, anti-selectina L, anti-selectina E, y anti-selectina P, moléculas tóxicas tales como ciclofosfamida, metotrexato, Azatioprina, mizoribina, 15-desoxuspergualina, neomicina, estaurosporina, genesteína, herbimicina A, exotoxina A de Pseudomonas, saporina, Rituxán, Ricina, gemtuzumab ozogamicina, toxina Shiga, metales pesados como mercuriales inorgánicos y orgánicos, y FN18-CRM9, radioisótopos tales como isótopos incorporados de yodo, cobalto, selenio, tritio y fósforo, y haptenos tales como DNP y digoxigenina, y anticuerpos de los mismos, o derivados de anticuerpos o fragmentos de los mismos y combinaciones de los mismos.

187. Uso de una molécula MHC en un método histológico.

188. Uso de una molécula MHC en un método citológico.

189. Uso de una molécula MHC de acuerdo con el artículo 187 o 188 en un método para determinar la presencia de células que reconocen MHC en una muestra, en cuyo método las células que reconocen MHC de la muestra están montadas en un soporte.

190. Uso de una molécula MHC de acuerdo con el artículo 187 o 188, en un método para monitorizar la presencia de células que reconocen MHC en una muestra, en cuyo método las células que reconocen MHC de la muestra están montadas en un soporte.

191. Uso de una molécula MHC de acuerdo con el artículo 187 o 188 en un método para determinar el estado de una enfermedad que implica células que reconocen MHC, en cuyo método las células que reconocen MHC de la muestra están montadas en un soporte.

192. Uso de una molécula MHC de acuerdo con el artículo 187 o 188 en un método para establecer un pronóstico de una enfermedad que implica células que reconocen MHC, en cuyo método las células que reconocen MHC de la muestra están montadas en un soporte.

193. Uso de una molécula MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 187-192, en donde el soporte es un soporte sólido o semisólido.

194. Uso de una molécula MHC de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 187-193, en donde el soporte se selecciona de portaobjetos de vidrio, membranas, filtros, portaobjetos de polímero, portaobjetos de cámara, placas y placas Petri.

195. Uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 187-194, en donde la muestra se selecciona de material histológico, material citológico, tumores primarios, metástasis orgánicas secundarias, aspirados con aguja fina, tejido del bazo, muestras de médula ósea, extensiones celulares, muestras citológicas exfoliativas, preparaciones por impronta, frotis orales, frotis laríngeos, frotis vaginales, lavado bronquial, lavado gástrico, del cordón umbilical, y de fluidos corporales tales como sangre (por ejemplo, de una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de la sangre o de otras preparaciones derivadas de la sangre tales como productos de leucoféresis), de muestras de esputo, expectorados, y aspirados bronquiales.

196. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 187-195, en donde la molécula MHC es una molécula MHC Clase I seleccionada del grupo que consiste en una cadena pesada, una cadena pesada combinada con una β_2m , una cadena pesada combinada un péptido y un dímero cadena pesada/ β_2m con un péptido; o una molécula MHC Clase II seleccionada del grupo que consiste en un dímero α/β , un dímero α/β con un péptido, dímero α/β combinado mediante una etiqueta de afinidad y un dímero α/β combinado mediante una etiqueta de afinidad con un péptido; o una molécula semejante a MHC Clase I o una molécula semejante a MHC Clase II.

197. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 187-196, en donde la molécula MHC es una molécula MHC de vertebrado tal como una molécula humana, una murina, una de rata, una porcina, una bovina o una aviar.

198. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 187-197, en donde la molécula MHC es una molécula MHC humana.

199. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 187-198, en donde la molécula MHC es una molécula

MHC sin péptido.

200. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 187-199, en donde la molécula MHC está unida a una entidad de unión.

201. Uso de acuerdo con el artículo 200, en donde la entidad de unión tiene unida a la misma de 1 a 10 moléculas MHC, tales como de 1 a 9, de 1 a 8, de 1 a 7, de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3 o 1 o 2 moléculas MHC.

202. Uso de acuerdo con el artículo 200, en donde la entidad de unión se selecciona de estreptavidina (SA) y avidina y derivados de las mismas, biotina, inmunoglobulinas, anticuerpos (monoclonal, policlonal, y recombinante), fragmentos de anticuerpo y derivados de los mismos, dominio de cremallera de leucina de AP-1 (jun y fos), hexa-his (resto de quelato de metal), hexa-hat GST (glutación S-transferasa) afinidad de glutatión, péptido de unión a calmodulina (CBP), Etiqueta Strep, Dominio de Unión a Celulosa, Proteína de Unión a Maltosa, Etiqueta S-Péptido, Etiqueta de Unión a Quitina, Epítopos Inmunoreactivos, Etiquetas de Epítopo, Etiqueta E2, Etiqueta de Epítopo HA, Epítopo Myc, Epítopo FLAG, Epítopos AU1 y AU5, Epítopo Glu-Glu, Epítopo KT3, Epítopo IRS, Epítopo Btag, Epítopo de proteína Quinasa C, Epítopo VSV, lecitinas que median la unión a una diversidad de compuestos, incluyendo carbohidratos, lípidos y proteínas, por ejemplo ConA (*Canavalia ensiformis*) o WGA (aglutinina de germen de trigo) y tetranectina o Proteína A o G (afinidad de anticuerpo).

203. Uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 187-202, en donde la molécula MHC comprende además un compuesto de marcaje.

204. Uso de acuerdo con el artículo 203, en donde el compuesto de marcaje puede detectarse directa o indirectamente.

205. Uso de acuerdo con el artículo 203 o 204, en donde el compuesto de marcaje es un marcador fluorescente, un marcador enzimático, un radioisótopo, un marcador quimioluminiscente, un marcador bioluminiscente, un polímero, una partícula de metal, un hapteno, un anticuerpo, o un tinte.

206. Uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 203-205, en donde el compuesto de marcaje se selecciona de 5- (y 6)-carboxifluoresceína, 5- o 6-carboxifluoresceína, ácido 6-(fluorescein)-5-(y 6)-carboxamido hexanoico, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, tetrametilrodamina, y agentes de tinción tales como Cy2, Cy3, y Cy5, cumarina sustituida opcionalmente incluyendo AMCA, PerCP, ficobiliproteínas incluyendo R-ficoeritrina (RPE) y alofcoeritrina (APC), Rojo Texas, Rojo Princeton, proteína verde fluorescente (GFP) y análogos de la misma, y conjugados de R-ficoeritrina y alofcoeritrina y, por ejemplo, Cy5 o Rojo Texas, y marcadores fluorescentes inorgánicos basados en nanocristales semiconductores (como nanocristales quantum dot y Qdot™) y marcadores fluorescentes de tiempo resuelto basados en lantánidos como Eu3+ y Sm3+, de haptenos tales como DNP, biotina, y digoxigenina o se selecciona de marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (GAL), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, beta-N-acetil-glucosaminidasa, β-glucuronidasa, invertasa, Xantina Oxidasa, luciferasa de luciérnaga y glucosa oxidasa (GO) o se selecciona de marcadores luminiscentes tales como luminol, isoluminol, ésteres de acridinio, 1,2-dioxetanos y piridopiridazinas o se selecciona de marcadores radiactivos tales como isótopos incorporados de yodo, cobalto, selenio, tritio y fósforo.

207. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 203-206, en donde el compuesto de marcaje está unido a la molécula MHC y/o la entidad de unión.

208. Un método para detectar la presencia de células que reconocen MHC en una muestra que comprende las etapas de

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC montada en un soporte,
- (b) poner en contacto la muestra con una molécula MHC como se define en los artículos 187-207 y
- (c) determinar cualquier unión de la molécula MHC, cuya unión indica la presencia de células que reconocen MHC.

209. Un método para monitorizar células que reconocen MHC que comprende las etapas de

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC montada en un soporte,
- (b) poner en contacto la muestra con una molécula MHC como se define en los artículos 187-207 y
- (c) determinar cualquier unión de la molécula MHC, monitorizando así células que reconocen MHC.

210. Un método para el pronóstico de una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC montada en un soporte,
- (b) poner en contacto la muestra con una molécula MHC como se define en los artículos 187-207 y
- (c) determinar cualquier unión de la molécula MHC, estableciendo así un pronóstico de una enfermedad que implica células que reconocen MHC.

211. Un método para determinar el estado de una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC montada en un soporte,
- (b) poner en contacto la muestra con una molécula MHC como se define en los artículos 187-207 y
- (c) determinar cualquier unión de la molécula MHC, determinando así el estado de una enfermedad que implica células que reconocen MHC.

212. Un método para el diagnóstico de una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC montada en un soporte,
- (b) poner en contacto la muestra con una molécula MHC como se define en los artículos 187-207 y
- (c) determinar cualquier unión de la molécula MHC, diagnosticando así una enfermedad que implica células que reconocen MHC.

213. Un método para determinar la eficacia de un medicamento contra una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de

- (a) proporcionar una muestra de un sujeto que recibe tratamiento con un medicamento montada en un soporte,
- (b) poner en contacto la muestra con una molécula MHC como se define en los artículos 187-207 y
- (c) determinar cualquier unión de la molécula MHC, determinando así la eficacia del medicamento.

214. El método de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 208-213, en donde las células que reconocen MHC están implicadas en una enfermedad de origen inflamatorio, autoinmune, alérgico, vírico, canceroso, infeccioso, alo o xenogénico (injerto frente a hospedador y hospedador frente a injerto).

215. El método de acuerdo con el artículo 214, en donde la enfermedad es una enfermedad inflamatoria crónica del intestino tales como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, esclerosis, diabetes tipo I, artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis atópica, asma, melanoma maligno, carcinoma renal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer del útero, cáncer cervical, cáncer prostático, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, linfoma cutáneo, carcinoma hepático, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, enfermedad relacionada con el rechazo, enfermedad relacionada con injerto frente a hospedador, o una enfermedad vírica asociada a hepatitis, SIDA, sarampión, viruela, varicela, rubeola o herpes.

216. El método de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 208-214, en donde las células que reconocen MHC se seleccionan de subpoblaciones de células T CD3+, células T gamma, delta, células T alfa, beta, células T CD4+, células T auxiliares, células T CD8+, células T supresoras, células T citotóxicas CD8+, CTL, células NK, células NKT, células LAK, y MAK.

210. El método de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 201-209, en donde la muestra se selecciona de material histológico, material citológico, tumores primarios, metástasis orgánicas secundarias, aspirados con aguja fina, tejido del bazo, muestras de médula ósea, extensiones celulares, muestras citológicas exfoliativas, preparaciones por impronta, frotis orales, frotis laríngeos, frotis vaginales, lavado bronquial, lavado gástrico, del cordón umbilical, y de fluidos corporales tales como sangre (por ejemplo, de una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de la sangre o de otras preparaciones derivadas de la sangre tales como productos de leucoféresis), de muestras de esputo, expectorados, y aspirados bronquiales.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Winther, Lars Oestergaard Petersen, Lars Buus, Soeren Schoeller, Joergen Ruud, Erik Aamellem, Oeystein

<120> CONSTRUCCIONES DE MOLÉCULA MHC NOVEDOSAS Y MÉTODOS PARA EMPLEAR ESTAS CONSTRUCCIONES PARA DIAGNÓSTICO Y TERAPIA Y USOS DE MOLÉCULAS DE MHC

<130> 3276.1005-000

	<140> 10/097,106 <141> 13-03-2002
5	<150> 60/275,470 <151> 14-03-2001
	<150> 60/275,448 <151> 14-03-2001
10	<150> 60/275,447 <151> 14-03-2001
	<160> 197
15	<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
	<210> 1 <211> 10 <212> PRT
20	<213> Desconocido
	<220> <223> Análogo del péptido MART-1
25	<400> 1
	Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val 1 5 10
30	<210> 2 <211> 9 <212> PRT <213> Desconocido
35	<220> <223> aminoácidos 58-66 de la proteína de matriz de la gripe
	<400> 2
40	Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu 1 5
45	<210> 3 <211> 9 <212> PRT <213> Desconocido
50	<220> <223> R9V péptido P53 tipo silvestre
	<400> 3
	Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val 1 5
55	<210> 4 <211> 11 <212> PRT <213> Desconocido
60	<220> <223> G11V péptido P53 tipo silvestre
	<400> 4

ES 2 747 357 T3

		Gly	Leu	Ala	Pro	Pro	Gln	His	Leu	Ile	Arg	Val
		1				5					10	
5	<210> 5											
	<211> 9											
	<212> PRT											
	<213> Desconocido											
10	<220>											
	<223> péptido gp100											
	<221> VARIANTE											
	<222> 8											
	<223> Xaa = ornitina											
15	<400> 5											
		Lys	Thr	Trp	Gly	Gln	Tyr	Trp	Xaa	Val		
		1				5						
20	<210> 6											
	<211> 9											
	<212> PRT											
	<213> Desconocido											
25	<220>											
	<223> análogo del péptido surl/M2 de survivina											
	<400> 6											
		Leu	Met	Leu	Gly	Glu	Phe	Leu	Lys	Leu		
30		1				5						
	<210> 7											
	<211> 9											
	<212> PRT											
35	<213> Desconocido											
	<220>											
	<223> péptido MAGE-3											
40	<400> 7											
		Phe	Leu	Trp	Gly	Pro	Arg	Ala	Leu	Val		
		1				5						
45	<210> 8											
	<211> 12											
	<212> PRT											
	<213> Desconocido											
50	<220>											
	<223> Motivo de unión de MHC											
	<221> VARIANTE											
	<222> 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10											
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido											
55	<400> 8											
		Xaa	Leu	Met	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Val	Leu
		1				5					10	

	<210> 9	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Desconocido	
5	<220>	
	<223> Motivo de unión de MHC	
	<221> VARIANTE	
10	<222> 1, 4, 5, 6, 7, 8	
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido	
	<400> 9	
15		Xaa Leu Met Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Leu 1 5 10
	<210> 10	
	<211> 11	
	<212> PRT	
20	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Motivo de unión de MHC	
	<221> VARIANTE	
25	<222> 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9	
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido	
	<400> 10	
30		Xaa Leu Met Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Leu 1 5 10
	<210> 11	
	<211> 13	
	<212> PRT	
35	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Motivo de unión de MHC	
40	<221> VARIANTE	
	<222> 1, 7, 8, 9, 10, 11, 12	
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido	
45	<400> 11	
		Xaa Val Leu Ile Met Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu 1 5 10
	<210> 12	
	<211> 14	
	<212> PRT	
50	<213> Desconocido	
	<220>	
55	<223> Motivo de unión de MHC	
	<221> VARIANTE	
	<222> 1, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido	
60	<400> 12	

		Xaa	Val	Leu	Ile	Met	Gln	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu
		1				5								10	
5		<210> 13 <211> 12 <212> PRT <213> Desconocido													
10		<220> <223> Motivo de unión de MHC <221> VARIANTE <222> 1, 7, 8, 9, 10, 11 <223> Xaa = Cualquier aminoácido													
15		<400> 13													
		Xaa	Val	Leu	Ile	Met	Gln	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	
		1				5								10	
20		<210> 14 <211> 12 <212> PRT <213> Desconocido													
25		<220> <223> Motivo de unión de MHC													
30		<221> VARIANTE <222> 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10 <223> Xaa = Cualquier aminoácido <400> 14													
		Xaa	Val	Gln	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Val	
		1				5								10	
35		<210> 15 <211> 13 <212> PRT <213> Desconocido													
40		<220> <223> Motivo de unión de MHC <221> VARIANTE													
45		<222> 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 <223> Xaa = Cualquier aminoácido <400> 15													
		Xaa	Val	Gln	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Val	
		1				5								10	
50		<210> 16 <211> 11 <212> PRT <213> Desconocido													
55		<220> <223> Motivo de unión de MHC													
60		<221> VARIANTE <222> 1, 5, 6, 7, 8, 9 <223> Xaa = Cualquier aminoácido													

	<400> 16	
5		Xaa Val Gln Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Val 1 5 10
	<210> 17 <211> 12 <212> PRT <213> Desconocido	
10	<220> <223> Motivo de unión de MHC	
15	<221> VARIANTE <222> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 <223> Xaa = Cualquier aminoácido	
	<400> 17	
20		Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Leu Phe 1 5 10
	<210> 18 <211> 11 <212> PRT <213> Desconocido	
25	<220> <223> Motivo de unión de MHC	
30	<221> VARIANTE <222> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 <223> Xaa = Cualquier aminoácido	
	<400> 18	
35		Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Leu Phe 1 5 10
	<210> 19 <211> 10 <212> PRT <213> Desconocido	
40	<220> <223> Motivo de unión de MHC	
45	<221> VARIANTE <222> 1, 3, 4, 5, 6, 7 <223> Xaa = Cualquier aminoácido	
50	<400> 19	
		Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Leu Phe 1 5 10
55	<210> 20 <211> 14 <212> PRT <213> Desconocido	
60	<220> <223> Motivo de unión de MHC	

	<221> VARIANTE
	<222> 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido
5	<400> 20
	Xaa Leu Val Met Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Tyr Phe 1 5 10
10	<210> 21 <211> 12 <212> PRT <213> Desconocido
15	<220> <223> Motivo de unión de MHC
20	<221> VARIANTE <222> 1, 5, 6, 7, 8, 9 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
	<400> 21
	Xaa Leu Val Met Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Tyr Phe 1 5 10
25	<210> 22 <211> 13 <212> PRT <213> Desconocido
30	<220> <223> Motivo de unión de MHC
35	<221> VARIANTE <222> 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
	<400> 22
	Xaa Leu Val Met Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Tyr Phe 1 5 10
40	<210> 23 <211> 10 <212> PRT <213> Desconocido
45	<220> <223> Motivo de unión de MHC
50	<221> VARIANTE <222> 1, 4, 5, 6, 7, 8 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
	<400> 23
55	Xaa Val Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Lys 1 5 10
60	<210> 24 <211> 12 <212> PRT <213> Desconocido

ES 2 747 357 T3

<220>
 <223> Motivo de unión de MHC

 <221> VARIANTE
 5 <222> 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

 <400> 24

 Xaa Val Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Lys
 1 5 10

 <210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 15 <213> Desconocido

 <220>
 <223> Motivo de unión de MHC

 <221> VARIANTE
 20 <222> 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

 <400> 25
 25
 Xaa Val Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Lys
 1 5 10

 <210> 26
 <211> 12
 30 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 <223> Motivo de unión de MHC
 35
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

 <400> 26
 40
 Xaa Val Thr Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Leu
 1 5 10

 <210> 27
 <211> 13
 45 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 <223> Motivo de unión de MHC
 50
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 55
 <400> 27

 Xaa Val Thr Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Leu
 1 5 10

 60 <210> 28
 <211> 11
 <212> PRT

	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Motivo de unión de MHC	
5	<221> VARIANTE	
	<222> 1, 5, 6, 7, 8, 9	
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido	
10	<400> 28	
		Xaa Val Thr Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Leu 1 5 10
15	<210> 29	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Desconocido	
20	<220>	
	<223> Motivo de unión de MHC	
	<221> VARIANTE	
	<222> 1, 4, 5, 8, 9, 10	
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido	
25	<400> 29	
		Xaa Arg Lys Xaa Xaa Arg His Xaa Xaa Xaa Leu 1 5 10
30	<210> 30	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Desconocido	
35	<220>	
	<223> Motivo de unión de MHC	
	<221> VARIANTE	
	<222> 1, 4, 5, 8, 9	
40	<223> Xaa = Cualquier aminoácido	
	<400> 30	
		Xaa Arg Lys Xaa Xaa Arg His Xaa Xaa Leu 1 5 10
45	<210> 31	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> Desconocido	
50	<220>	
	<223> Motivo de unión de MHC	
	<221> VARIANTE	
	<222> 1, 4, 5, 8, 9, 10, 11	
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido	
	<400> 31	
60		Xaa Arg Lys Xaa Xaa Arg His Xaa Xaa Xaa Xaa Leu 1 5 10

	<210> 32	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Desconocido	
5	<220>	
	<223> Motivo de unión de MHC	
	<221> VARIANTE	
10	<222> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8	
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido	
	<400> 32	
15	Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Tyr Ile Leu Trp	
	1 5 10	
	<210> 33	
	<211> 12	
	<212> PRT	
20	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Motivo de unión de MHC	
	<221> VARIANTE	
25	<222> 1, 3, 4, 5, 6, 7	
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido	
	<400> 33	
30	Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Tyr Ile Leu Trp	
	1 5 10	
	<210> 34	
	<211> 14	
	<212> PRT	
35	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Motivo de unión de MHC	
40	<221> VARIANTE	
	<222> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido	
	<400> 34	
45	Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Tyr Ile Leu Trp	
	1 5 10	
	<210> 35	
	<211> 14	
50	<212> PRT	
	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Motivo de unión de MHC	
55	<221> VARIANTE	
	<222> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido	
60	<400> 35	

ES 2 747 357 T3

		Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Phe	Met	Leu	Ile	
		1				5				10					
5		<210> 36 <211> 13 <212> PRT <213> Desconocido													
10		<220> <223> Motivo de unión de MHC <221> VARIANTE <222> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 <223> Xaa = Cualquier aminoácido													
15		<400> 36													
		Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Phe	Met	Leu	Ile	
		1				5					10				
20		<210> 37 <211> 12 <212> PRT <213> Desconocido													
25		<220> <223> Motivo de unión de MHC <221> VARIANTE <222> 1, 3, 4, 5, 6, 7 <223> Xaa = Cualquier aminoácido													
30		<400> 37													
		Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Phe	Met	Leu	Ile	
		1				5					10				
35		<210> 38 <211> 14 <212> PRT <213> Desconocido													
40		<220> <223> Motivo de unión de MHC <221> VARIANTE <222> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 <223> Xaa = Cualquier aminoácido													
45		<400> 38													
		Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Phe	Met	Leu	Ile
		1				5					10				
50		<210> 39 <211> 12 <212> PRT <213> Desconocido													
55		<220> <223> Motivo de unión de MHC <221> VARIANTE <222> 1, 3, 4, 5, 6, 7 <223> Xaa = Cualquier aminoácido													
60		<400> 38													

<400> 39	
5	Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Met Leu Ile 1 5 10 <210> 40 <211> 13 <212> PRT <213> Desconocido
10	<220> <223> Motivo de unión de MHC
15	<221> VARIANTE <222> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
<400> 40	
20	Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Met Leu Ile 1 5 10 <210> 41 <211> 13 <212> PRT <213> Desconocido
25	<220> <223> Motivo de unión de MHC
30	<221> VARIANTE <222> 1, 4, 5, 6, 7, 8 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
<400> 41	
35	Xaa Asp Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Met Leu Ile Leu 1 5 10 <210> 42 <211> 14 <212> PRT <213> Desconocido
40	<220> <223> Motivo de unión de MHC
45	<221> VARIANTE <222> 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
<400> 42	
50	Xaa Asp Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Met Leu Ile Leu 1 5 10 <210> 43 <211> 12 <212> PRT <213> Desconocido
55	<220> <223> Motivo de unión de MHC
60	<221> VARIANTE <222> 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

	<221> VARIANTE
	<222> 1, 3, 4, 5, 6, 7
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido
5	<400> 43
	Xaa Asp Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Met Leu Ile Leu 1 5 10
10	<210> 44 <211> 11 <212> PRT <213> Desconocido
15	<220> <223> Motivo de unión de MHC
20	<221> VARIANTE <222> 1, 5, 6, 7, 8, 9 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
	<400> 44
	Xaa Ala Pro Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Ile 1 5 10
25	<210> 45 <211> 12 <212> PRT <213> Desconocido
30	<220> <223> Motivo de unión de MHC
35	<221> VARIANTE <222> 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
	<400> 45
	Xaa Ala Pro Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Ile 1 5 10
40	<210> 46 <211> 13 <212> PRT <213> Desconocido
45	<220> <223> Motivo de unión de MHC
50	<221> VARIANTE <222> 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
	<400> 46
55	Xaa Ala Pro Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Ile 1 5 10
60	<210> 47 <211> 12 <212> PRT <213> Desconocido <220>

<223> Motivo de unión de MHC

<221> VARIANTE
 <222> 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

5
 <400> 47

10
 Xaa Pro Ala Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Val
 1 5 10

<210> 48
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Desconocido

15
 <220>
 <223> Motivo de unión de MHC

20
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 48

25
 Xaa Pro Ala Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Val
 1 5 10

<210> 49
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Desconocido

30
 <220>
 <223> Motivo de unión de MHC

35
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 5, 6, 7, 8, 9
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

40
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 5, 6, 7, 8, 9
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 49

45
 Xaa Pro Ala Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Val
 1 5 10

<210> 50
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Desconocido

50
 <220>
 <223> Motivo de unión de MHC

55
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 50

60
 Xaa Ala Pro Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Ile Phe
 1 5 10

5 <210> 51
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 <223> Motivo de unión de MHC

 10 <221> VARIANTE
 <222> 1, 5, 6, 7, 8, 9
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

 <400> 51

 15 Xaa Ala Pro Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Ile Phe
 1 5 10

 20 <210> 52
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 <223> Motivo de unión de MHC

 25 <221> VARIANTE
 <222> 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

 30 <400> 52

 Xaa Ala Pro Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Ile Phe
 1 5 10

 35 <210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 <223> Motivo de unión de MHC

 40 <221> VARIANTE
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

 45 <400> 53

 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Val Ile Val
 1 5 10

 50 <210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 55 <220>
 <223> Motivo de unión de MHC

 <221> VARIANTE
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
 60 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

 <400> 54

ES 2 747 357 T3

		Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Val Ile Val
		1 5 10
5	<210> 55	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> Desconocido	
10	<220>	
	<223> Motivo de unión de MHC	
	<221> VARIANTE	
	<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido	
15	<400> 55	
		Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Val Ile Val
		1 5 10
20	<210> 56	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Desconocido	
25	<220>	
	<223> Motivo de unión de MHC	
	<221> VARIANTE	
	<222> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8	
30	<223> Xaa = Cualquier aminoácido	
	<400> 56	
		Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ile Val Met Tyr
		1 5 10
35	<210> 57	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> Desconocido	
40	<220>	
	<223> Motivo de unión de MHC	
	<221> VARIANTE	
	<222> 1, 3, 4, 5, 6, 7	
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido	
45	<400> 57	
		Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ile Val Met Tyr
		1 5 10
50	<210> 58	
	<211> 14	
	<212> PRT	
55	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Motivo de unión de MHC	
60	<221> VARIANTE	
	<222> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	

ES 2 747 357 T3

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 58

5 Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ile Val Met Tyr
1 5 10

<210> 59

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Desconocido

<220>

<223> Motivo de unión de MHC

15 <221> VARIANTE

<222> 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 59

20 Xaa Ala Ser Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Trp
1 5 10

<210> 60

<211> 11

25 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Motivo de unión de MHC

30 <221> VARIANTE

<222> 1, 5, 6, 7, 8, 9

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

35 <400> 60

Xaa Ala Ser Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Trp
1 5 10

<210> 61

40 <211> 12

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

45 <223> Motivo de unión de MHC

<221> VARIANTE

<222> 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

50 <400> 61

Xaa Ala Ser Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Trp
1 5 10

55 <210> 62

<211> 11

<212> PRT

<213> Desconocido

60 <220>

<223> Motivo de unión de MHC

5	<221> VARIANTE
	<222> 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido
	<400> 62
	Xaa Gln Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Tyr 1 5 10
10	<210> 63
	<211> 10
	<212> PRT
	<213> Desconocido
15	<220>
	<223> Motivo de unión de MHC
	<221> VARIANTE
	<222> 1, 4, 5, 6, 7, 8
20	<223> Xaa = Cualquier aminoácido
	<400> 63
	Xaa Gln Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Tyr 1 5 10
25	<210> 64
	<211> 12
	<212> PRT
	<213> Desconocido
30	<220>
	<223> Motivo de unión de MHC
	<221> VARIANTE
	<222> 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
35	<223> Xaa = Cualquier aminoácido
	<400> 64
	Xaa Gln Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Tyr 1 5 10
40	<210> 65
	<211> 9
	<212> PRT
	<213> Desconocido
45	<220>
	<223> Motivo de unión de MHC
	<221> VARIANTE
	<222> 1, 2, 4, 7, 8
50	<223> Xaa = Cualquier aminoácido
	<400> 65
55	
	Xaa Xaa Lys Xaa Lys Arg Xaa Xaa Leu 1 5
	<210> 66
	<211> 11
60	<212> PRT
	<213> Desconocido

<220>
<223> Motivo de unión de MHC

5 <221> VARIANTE
<222> 1, 2, 4, 7, 8, 9, 10
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 66

10 Xaa Xaa Lys Xaa Lys Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Leu
1 5 10

<210> 67
<211> 10
15 <212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Motivo de unión de MHC

20 <221> VARIANTE
<222> 1, 2, 4, 7, 8, 9
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

25 <400> 67

Xaa Xaa Lys Xaa Lys Arg Xaa Xaa Xaa Leu
1 5 10

<210> 68
30 <211> 13
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
35 <223> Motivo de unión de MHC

<221> VARIANTE
<222> 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

40 <400> 68

Xaa Tyr Pro Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Phe
1 5 10

45 <210> 69
<211> 12
<212> PRT
<213> Desconocido

50 <220>
<223> Motivo de unión de MHC

<221> VARIANTE
<222> 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10
55 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 69

Xaa Tyr Pro Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Phe
1 5 10

60 <210> 70

	<211> 11
	<212> PRT
	<213> Desconocido
5	<220>
	<223> Motivo de unión de MHC
	<221> VARIANTE
	<222> 1, 5, 6, 7, 8, 9
10	<223> Xaa = Cualquier aminoácido
	<400> 70
	Xaa Tyr Pro Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Phe
	1 5 10
15	<210> 71
	<211> 13
	<212> PRT
	<213> Desconocido
20	<220>
	<223> Motivo de unión de MHC
	<221> VARIANTE
25	<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido
	<400> 71
	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Phe Met Ile
30	1 5 10
	<210> 72
	<211> 11
	<212> PRT
35	<213> Desconocido
	<220>
	<223> Motivo de unión de MHC
40	<221> VARIANTE
	<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido
	<400> 72
45	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Phe Met Ile
	1 5 10
	<210> 73
	<211> 12
50	<212> PRT
	<213> Desconocido
	<220>
	<223> Motivo de unión de MHC
55	<221> VARIANTE
	<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
	<223> Xaa = Cualquier aminoácido
60	<400> 73

ES 2 747 357 T3

		Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Phe	Met	Ile	
		1				5					10			
5		<210> 74 <211> 11 <212> PRT <213> Desconocido												
10		<220> <223> Motivo de unión de MHC <221> VARIANTE <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 <223> Xaa = Cualquier aminoácido												
15		<400> 74												
		Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Ile	Val	Phe	
		1				5						10		
20		<210> 75 <211> 13 <212> PRT <213> Desconocido												
25		<220> <223> Motivo de unión de MHC <221> VARIANTE <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 <223> Xaa = Cualquier aminoácido												
30		<400> 75												
		Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Ile	Val	Phe
		1				5					10			
35		<210> 76 <211> 12 <212> PRT <213> Desconocido												
40		<220> <223> Motivo de unión de MHC <221> VARIANTE <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 <223> Xaa = Cualquier aminoácido												
45		<400> 76												
		Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Ile	Val	Phe	
		1				5					10			
50		<210> 77 <211> 12 <212> PRT <213> Desconocido												
55		<220> <223> Motivo de unión de MHC <221> VARIANTE <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 <223> Xaa = Cualquier aminoácido												
60		<400> 76												

<400> 77

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ile Val Phe
1 5 10

5

<210> 78

<211> 11

<212> PRT

<213> Desconocido

10

<220>

<223> Motivo de unión de MHC

<221> VARIANTE

15

<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 78

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ile Val Phe
1 5 10

20

<210> 79

<211> 13

<212> PRT

25

<213> Desconocido

<220>

<223> Motivo de unión de MHC

<221> VARIANTE

30

<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 79

35

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ile Val Phe
1 5 10

<210> 80

<211> 12

40

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Motivo de unión de MHC

45

<221> VARIANTE

<222> 3, 4, 5, 8, 9, 12

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 80

50

Met Val Xaa Xaa Xaa Met Tyr Xaa Xaa Met Val Xaa
1 5 10

<210> 81

<211> 12

55

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

60

<223> Motivo de unión de MHC

	<221> VARIANTE <222> 3, 4, 5, 8, 9, 12 <223> Xaa = Cualquier aminoácido	
5	<400> 81	
		Phe Leu Xaa Xaa Xaa Phe Leu Xaa Xaa Ile Ala Xaa 1 5 10
10	<210> 82 <211> 12 <212> PRT <213> Desconocido	
15	<220> <223> Motivo de unión de MHC	
20	<221> VARIANTE <222> 3, 4, 5, 8, 9, 12 <223> Xaa = Cualquier aminoácido	
	<400> 82	
		Met Val Xaa Xaa Xaa Met Tyr Xaa Xaa Met Val Xaa 1 5 10
25	<210> 83 <211> 12 <212> PRT <213> Desconocido	
30	<220> <223> Motivo de unión de MHC	
35	<221> VARIANTE <222> 3, 4, 5, 8, 9, 12 <223> Xaa = Cualquier aminoácido	
	<400> 83	
40		Phe Leu Xaa Xaa Xaa Phe Leu Xaa Xaa Ile Ala Xaa 1 5 10
45	<210> 84 <211> 10 <212> PRT <213> Desconocido	
50	<220> <223> Motivo de unión de MHC	
55	<221> VARIANTE <222> 3, 4, 6, 8, 9 <223> Xaa = Cualquier aminoácido	
	<400> 84	
		Ile Leu Xaa Xaa Leu Xaa Arg Xaa Xaa Tyr 1 5 10
60	<210> 85 <211> 9 <212> PRT <213> Desconocido	

	<220>
	<223> Motivo de unión de MHC
5	<221> VARIANTE <222> 2, 3, 5, 7, 8 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
	<400> 85
10	Val Xaa Xaa Val Xaa Lys Xaa Xaa Phe 1 5
	<210> 86 <211> 11 <212> PRT <213> Desconocido
15	<220> <223> Motivo de unión de MHC
20	<221> VARIANTE <222> 2, 3, 6, 9, 10 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
	<400> 86
25	Trp Xaa Xaa Val Lys Xaa Asp Ser Xaa Xaa Asn 1 5 10
30	<210> 87 <211> 11 <212> PRT <213> Desconocido
35	<220> <223> MCH motivo de unión de
	<221> VARIANTE <222> 3, 4, 6, 8 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
40	<400> 87
	Phe Tyr Xaa Xaa Ala Xaa Asn Thr Xaa Xaa Gln 1 5 10
45	<210> 88 <211> 12 <212> PRT <213> Desconocido
50	<220> <223> Motivo de unión de MHC
	<221> VARIANTE <222> 3, 4, 6, 9, 10 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
55	<400> 88
	Ile Leu Xaa Xaa Asn Xaa Ala Ser Xaa Xaa Ile Leu 1 5 10
60	<210> 89 <211> 9

ES 2 747 357 T3

	Val	Leu	Glu	Trp	Arg	Phe	Asp	Ser	Arg	Leu
	1				5					10
	<210> 96									
	<211> 9									
5	<212> PRT									
	<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana									
	<400> 96									
	Lys	Ile	Arg	Leu	Arg	Pro	Gly	Gly	Lys	
10	1				5					
	<210> 97									
	<211> 9									
	<212> PRT									
15	<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana									
	<400> 97									
	Arg	Leu	Arg	Pro	Gly	Gly	Lys	Lys	Lys	
20	1				5					
	<210> 98									
	<211> 10									
	<212> PRT									
25	<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana									
	<400> 98									
	Arg	Leu	Arg	Pro	Gly	Gly	Lys	Lys	Lys	Tyr
30	1				5					10
	<210> 99									
	<211> 11									
	<212> PRT									
	<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana									
35	<400> 99									
	Ala	Leu	Val	Glu	Ile	Cys	Thr	Glu	Met	Glu
40	1				5					10
	<210> 100									
	<211> 9									
	<212> PRT									
	<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana									
45	<400> 100									
	Ala	Ile	Phe	Gln	Ser	Ser	Met	Thr	Lys	
50	1				5					
	<210> 101									
	<211> 10									
	<212> PRT									
	<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana									
	<400> 101									
55	Thr	Val	Tyr	Tyr	Gly	Val	Pro	Val	Trp	Lys
	1				5					10
	<210> 102									

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
 5 <400> 102
 Arg Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg
 1 5 10
 10 <210> 103
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
 15 <400> 103
 Gln Val Pro Leu Arg Pro Met Thr Tyr Lys
 1 5 10
 20 <210> 104
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
 <400> 104
 Thr Leu Tyr Val Cys His Gln Arg Ile
 1 5
 25 <210> 105
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Aislado III-B del virus de inmunodeficiencia humana
 <400> 105
 Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro Gly Gly His Lys
 1 5 10
 35 <210> 106
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
 40 <400> 106
 Ala Ile Phe Gln Ser Ser Met Thr Lys
 1 5
 45 <210> 107
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
 50 <400> 107
 Pro Leu Arg Pro Met Thr Tyr Lys
 1 5
 55 <210> 108
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 108

Pro Leu Arg Pro Met Thr Tyr Lys
1 5

5 <210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

10 <400> 109

Ala Val Asp Leu Ser His Phe Leu Lys
1 5

15 <210> 110
<211> 9
<212> PRT
<213> Clado A/B/D aislado del virus de inmunodeficiencia humana

20 <400> 110

Ile Thr Leu Trp Gln Arg Pro Leu Val
1 5

25 <210> 111
<211> 9
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 111

Lys Tyr Lys Leu Lys His Ile Val Trp
1 5

30 <210> 112
<211> 11
<212> PRT
<213> Aislado HIL-1 del virus de inmunodeficiencia humana

35 <400> 112

Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Phe Lys Thr Leu
1 5 10

40 <210> 113
<211> 10
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

45 <400> 113

Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr
1 5 10

50 <210> 114
<211> 8
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

55 <400> 114

Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu
1 5

<210> 115
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
 5
 <400> 115

 Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp
 1 5
 10
 <210> 116
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
 15
 <400> 116

 Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp
 1 5 10
 20
 <210> 117
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
 25
 <400> 117

 Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp
 1 5 10
 30
 <210> 118
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
 <400> 118

 Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu
 1 5
 35
 <210> 119
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
 40
 <400> 119

 Glu Thr Phe Tyr Val Asp Gly Ala Ala Asn Arg
 1 5 10
 45
 <210> 120
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Clado A/B/D aislado del virus de inmunodeficiencia humana
 50
 <400> 120

 Ile Thr Leu Trp Gln Arg Pro Leu Val
 1 5
 55
 <210> 121
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Clado D aislado del virus de inmunodeficiencia humana

ES 2 747 357 T3

<400> 121

Asp Thr Val Leu Glu Glu Met Asn Leu

1

5

5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

10

<400> 122

Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr
1 5

15

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

20

<400> 123

Arg Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg
1 5 10

25

<210> 124

<211> 10

<212> PRT

<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

30

<400> 124

Pro Ile Gln Lys Glu Thr Trp Glu Thr Trp
1 5 10

35

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Aislado HXB2 del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 125

Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp
1 5

40

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

45

<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 126

Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val
1 5

50

<210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

55

<400> 127

Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met
1 5

5 <210> 128
<211> 10
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 128

10 Ser Pro Ala Ile Phe Gln Ser Ser Met Thr
1 5 10

15 <210> 129
<211> 10
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 129

20 Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile
1 5 10

25 <210> 130
<211> 9
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 130

30 Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu
1 5

35 <210> 131
<211> 10
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 131

40 Phe Pro Val Thr Pro Gln Val Pro Leu Arg
1 5 10

45 <210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 132

50 Arg Pro Met Thr Tyr Lys Ala Ala Leu
1 5

55 <210> 133
<211> 10
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 133

Thr Pro Gly Pro Gly Val Arg Tyr Pro Leu
1 5 10

<210> 134

ES 2 747 357 T3

<211> 8
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

5 <400> 134

Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu
1 5

<210> 135
<211> 9
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 135

Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn Thr Val
1 5

<210> 136
<211> 8
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 136

Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile
1 5

<210> 137
<211> 9
<212> PRT
<213> Aislado III-B del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 137

Arg Val Lys Glu Lys Tyr Gln His Leu
1 5

<210> 138
<211> 8
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 138

Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu
1 5

<210> 139
<211> 8
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

50 <400> 139

Trp Pro Thr Val Arg Glu Arg Met
1 5

<210> 140
<211> 8
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 140

		Phe Leu Lys Glu Lys Gly Gly Leu
		1 5
5	<210> 141 <211> 9 <212> PRT <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana	
	<400> 141	
10		Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala
		1 5
15	<210> 142 <211> 9 <212> PRT <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana	
	<400> 142	
20		Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu
		1 5
25	<210> 143 <211> 9 <212> PRT <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana	
	<400> 143	
30		Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe
		1 5
35	<210> 144 <211> 10 <212> PRT <213> Aislado VIH-1 del virus de inmunodeficiencia humana	
	<400> 144	
40		Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys
		1 5 10
45	<210> 145 <211> 9 <212> PRT <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana	
	<400> 145	
50		Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Tyr
		1 5
55	<210> 146 <211> 10 <212> PRT <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana	
	<400> 146	
		Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys
		1 5 10

ES 2 747 357 T3

<210> 147
<211> 9
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 147

Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys
1 5

<210> 148
<211> 8
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 148

Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gln Lys
1 5

<210> 149
<211> 8
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 149

Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu
1 5

<210> 150
<211> 10
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 150

Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ala Leu Lys Tyr
1 5 10

<210> 151
<211> 10
<212> PRT
<213> Aislado VIH-2 del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 151

Arg Arg Trp Ile Gln Leu Gly Leu Gln Lys
1 5 10

<210> 152
<211> 10
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 152

Arg Arg Gln Asp Ile Leu Asp Leu Trp Ile
1 5 10

<210> 153
<211> 10
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

	<400> 153	
		Gln Val Pro Leu Arg Pro Met Thr Tyr Lys 1 5 10
5	<210> 154 <211> 8 <212> PRT <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana	
10	<400> 154	
		Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp 1 5
15	<210> 155 <211> 9 <212> PRT <213> Aislado JH31 del virus de inmunodeficiencia humana	
20	<400> 155	
		Asn Ser Ser Lys Val Ser Gln Asn Tyr 1 5
25	<210> 156 <211> 9 <212> PRT <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana	
30	<400> 156	
		Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe 1 5
35	<210> 157 <211> 9 <212> PRT <213> Aislado U455 del virus de inmunodeficiencia humana	
40	<400> 157	
		Pro Pro Ile Pro Val Gly Asp Ile Tyr 1 5
45	<210> 158 <211> 9 <212> PRT <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana	
50	<400> 158	
		Thr Val Leu Asp Val Gly Asp Ala Tyr 1 5
55	<210> 159 <211> 10 <212> PRT <213> Aislado III-B del virus de inmunodeficiencia humana	
	<400> 159	

ES 2 747 357 T3

Val₁ Pro Leu Asp Glu₅ Asp Phe Arg Lys Tyr₁₀

5 <210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> Aislado III-B del virus de inmunodeficiencia humana
<400> 160

His₁ Pro Asp Ile Val₅ Ile Tyr Gln Tyr

10 <210> 161
<211> 11
<212> PRT
15 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
<400> 161

Val₁ Pro Val Trp Lys₅ Glu Ala Thr Thr Thr₁₀ Leu

20 <210> 162
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
<400> 162

Thr₁ Ala Val Pro Trp₅ Asn Ala Ser Trp

30 <210> 163
<211> 8
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
35 <400> 163

Val₁ Pro Leu Arg Pro₅ Met Thr Tyr

40 <210> 164
<211> 9
<212> PRT
<213> Aislado VIH-2 del virus de inmunodeficiencia humana
45 <400> 164

Asn₁ Pro Val Pro Val₅ Gly Asn Ile Tyr

50 <210> 165
<211> 9
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
<400> 165

Tyr₁ Phe Pro Asp Trp₅ Gln Asn Tyr Thr

55 <210> 166

ES 2 747 357 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
 5 <400> 166
 Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu
 1 5
 <210> 167
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
 <400> 167
 15 Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Tyr
 1 5
 <210> 168
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
 <400> 168
 Tyr Pro Gly Ile Lys Val Arg Gln Leu
 1 5
 <210> 169
 30 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Aislado SF2 del virus de inmunodeficiencia humana
 <400> 169
 Ala Glu Gln Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Trp
 1 5 10
 35 <210> 170
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Aislado SF33 del virus de inmunodeficiencia humana
 40 <400> 170
 Ala Glu Asn Leu Trp Val Thr Val Tyr
 1 5
 45 <210> 171
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Aislado VIH-1 del virus de inmunodeficiencia humana
 50 <400> 171
 Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu
 1 5 10
 55 <210> 172
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

ES 2 747 357 T3

<400> 172

Gly Ala Glu Thr Phe Tyr Val Asp Gly Ala
1 5 10

5 <210> 173
<211> 9
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

10 <400> 173

Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile
1 5

15 <210> 174
<211> 9
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

20 <400> 174

Glu Lys Glu Gly Lys Ile Ser Lys Ile
1 5

25 <210> 175
<211> 8
<212> PRT
<213> Aislado III-B del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 175

30 Thr Ala Phe Thr Ile Pro Ser Ile
1 5

<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> Aislado III-B del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 176

40 Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu
1 5

<210> 177
<211> 8
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

45 <400> 177

Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile
1 5

50 <210> 178
<211> 9
<212> PRT
<213> Aislado VIH-2 del virus de inmunodeficiencia humana

55 <400> 178

Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met Leu
1 5

ES 2 747 357 T3

<210> 179
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
 <400> 179
 Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr Thr Thr
 1 5 10
 10
 <210> 180
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Aislado III-B del virus de inmunodeficiencia humana
 <400> 180
 Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp
 1 5
 20
 <210> 181
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
 25 <400> 181
 Thr Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp
 1 5 10
 30
 <210> 182
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
 35 <400> 182
 Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe
 1 5 10
 40
 <210> 183
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
 <400> 183
 Thr Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp
 1 5 10
 45
 <210> 184
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana
 <400> 184
 Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp
 1 5
 55
 <210> 185
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 185

5 Gln Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Trp
1 5

<210> 186

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 186

15 His Thr Gln Gly Tyr Phe Pro Asp Trp Gln
1 5 10

<210> 187

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 187

25 Tyr Phe Pro Asp Trp Gln Asn Tyr Thr
1 5

<210> 188

<211> 10

<212> PRT

<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

30 <400> 188

Thr Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp
1 5 10

<210> 189

35 <211> 10

<212> PRT

<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 189

40 Thr Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp

1 5 10

<210> 190

<211> 10

<212> PRT

<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 190

50 Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr
1 5 10

<210> 191

<211> 10

<212> PRT

55 <213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 191

Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg Met Tyr
1 5 10

5 <210> 192
<211> 12
<212> PRT
<213> Aislado III-B del virus de inmunodeficiencia humana

10 <400> 192

Leu Val Gly Lys Leu Asn Trp Ala Ser Gln Ile Tyr
1 5 10

15 <210> 193
<211> 10
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

20 <400> 193

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val Tyr
1 5 10

25 <210> 194
<211> 8
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 194

Ala Val Asp Leu Ser His Phe Leu
1 5

30 <210> 195
<211> 11
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

<400> 195

Thr Gln Gly Tyr Phe Pro Asp Trp Gln Asn Tyr
1 5 10

40 <210> 196
<211> 8
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

45 <400> 196

Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu
1 5

50 <210> 197
<211> 9
<212> PRT
<213> Aislado LAI del virus de inmunodeficiencia humana

55 <400> 197

Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una construcción de moléculas MHC en forma soluble en un medio de solubilización o inmovilizada en un soporte sólido o semi-sólido, comprendiendo dicha construcción de moléculas MHC una molécula vehículo de polisacárido soluble unida al menos a 5 moléculas MHC, en donde dichas moléculas MHC están unidas a la molécula vehículo de polisacárido mediante más de una entidad de unión, en donde cada entidad de unión está unida a de 1 a 10 moléculas MHC.
- 10 2. La construcción de moléculas MHC de acuerdo con la reivindicación 1, en donde cada entidad de unión está unida a de 2 a 10 moléculas MHC.
- 15 3. La construcción de moléculas MHC de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho vehículo de polisacárido se selecciona del grupo que consiste en dextranos, carboxi metil dextrano, dextrano polialdehído, carboximetil dextran lactona, ciclodextrinas, pululanos, esquizofilano, escleroglucano, xantano, gellan, O-etilamino guaran, carragenanos, alginatos, agarosa, polisacáridos sintéticos, ficol y ficol carboximetilado.
- 20 4. La construcción de moléculas MHC de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende además
 - uno o más marcadores y/o
 - una o más moléculas biológicamente activas.
- 25 5. La construcción de moléculas MHC de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula MHC es una molécula MHC sin péptido o una molécula MHC cargada con péptido.
- 30 6. La construcción de moléculas MHC de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la entidad de unión se selecciona de estreptavidina y derivados de la misma, avidina y derivados de la misma, biotina, inmunoglobulinas, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos recombinantes, fragmentos de anticuerpo y derivados de los mismos, dominio de cremallera de leucina de AP-1, jun, fos, hexa-his, hexa-hat glutatión S-transferasa, afinidad de glutatión, péptido de unión a calmodulina, etiqueta Strep, Dominio de Unión a Celulosa, Proteína de Unión a Maltosa, Etiqueta S-Péptido, Etiqueta de Unión a Quitina, Epítomos Inmunoreactivos, Etiquetas de Epítomo, Etiqueta E2, Etiqueta de Epítomo HA, Epítomo Myc, Epítomo FLAG, Epítomos AU1 y AU5, Epítomo Glu-Glu, Epítomo KT3, Epítomo IRS, Epítomo Btag, Epítomo de Proteína Quinasa C, Epítomo VSV, lecitinas que median la unión a una diversidad de compuestos, incluyendo carbohidratos, lípidos y proteínas, preferentemente ConA o WGA y tetranectina o Proteína A y Proteína G.
- 35 7. Un método *ex vivo* para detectar o monitorizar la presencia de células que reconocen MHC en una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC que comprende las etapas de
 - 40 (a) poner en contacto una muestra con una o más construcción o construcciones de moléculas MHC de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y
 - (b) determinar cualquier unión de la una o más construcción o construcciones de moléculas MHC, cuya unión indica la presencia de células que reconocen MHC.
- 45 8. Un método *ex vivo* para establecer un pronóstico de una enfermedad, determinando el estado de una enfermedad o diagnosticando una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de
 - (a) poner en contacto una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC con o más construcción o construcciones de moléculas MHC de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y
 - 50 (b) determinar cualquier unión de la una o más construcción o construcciones de moléculas MHC, estableciendo de esta manera un pronóstico de una enfermedad o determinando el estado de una enfermedad o diagnosticando una enfermedad que implica células que reconocen MHC.
- 55 9. Un método *ex vivo* para determinar la eficacia de un medicamento frente a una enfermedad que implica células que reconocen MHC que comprende las etapas de
 - (a) poner en contacto una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC con o más construcción o construcciones de moléculas MHC de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y
 - 60 (b) determinar cualquier unión de la una o más construcción o construcciones de moléculas MHC, determinando de esta manera la eficacia del medicamento.
10. Una composición que comprende una o más construcción o construcciones de moléculas MHC de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 65 11. Un método *ex vivo* para obtener células que reconocen MHC que comprende poner en contacto una o más construcción o construcciones de moléculas MHC de acuerdo con una cualquiera de las

reivindicaciones 1-6 y una muestra que se sospecha que comprende células que reconocen MHC en condiciones mediante las cuales las células que reconocen MHC se unen a la una o más construcción o construcciones de moléculas MHC, y aislar la una o más construcción o construcciones de moléculas MHC unidas y las células que reconocen MHC.

- 5 12. Uso de una o más construcción o construcciones de moléculas MHC de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la expansión *ex vivo* de células que reconocen MHC.
- 10 13. Una vacuna que comprende como principio activo una o más construcción o construcciones de molécula MHC de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 15 14. Un método para producir una construcción de molécula MHC de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que comprende las etapas de hacer reaccionar un vehículo de polisacárido con al menos 5 moléculas MHC y opcionalmente hacer reaccionar la construcción de molécula MHC con uno o más marcadores y/o una o más moléculas bioactivas y/o una o más entidades de unión.

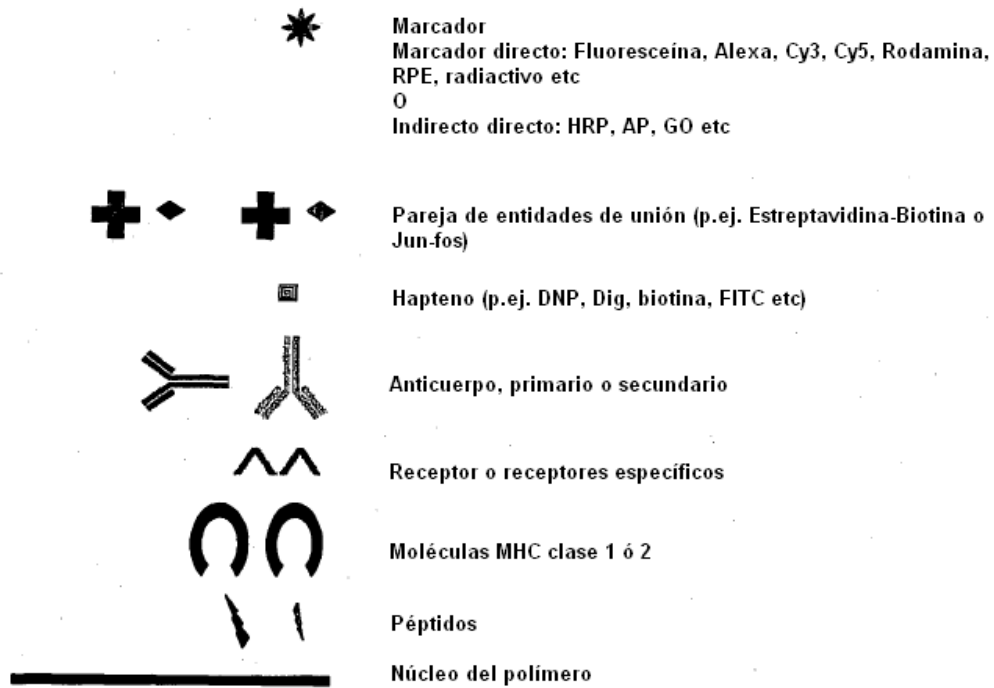


Figura 1

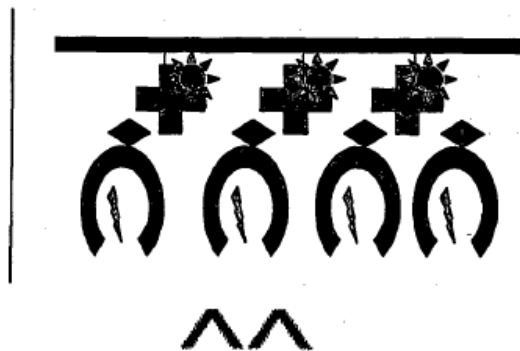


Figura 2

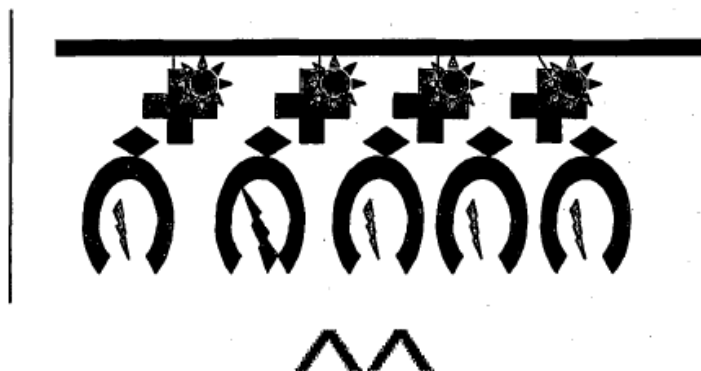


Figura 3

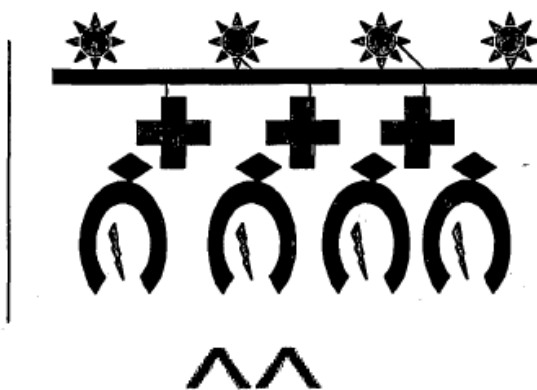


Figura 4

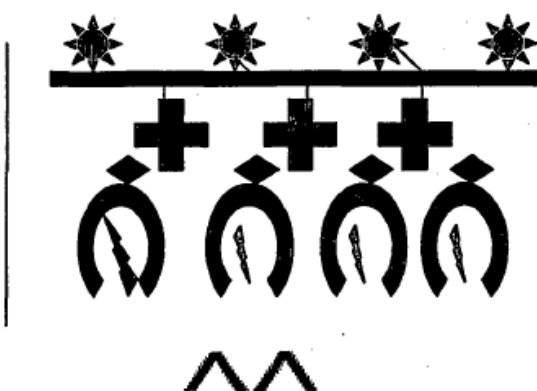


Figura 5

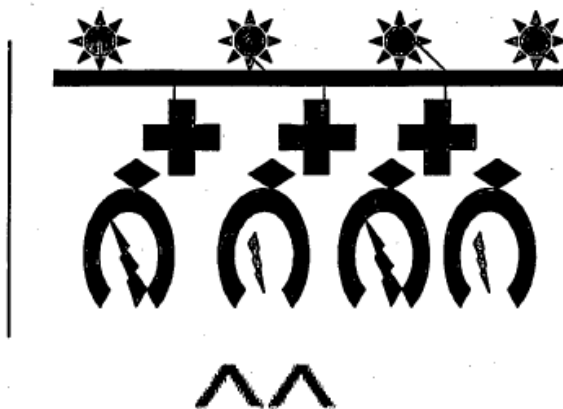


Figura 6

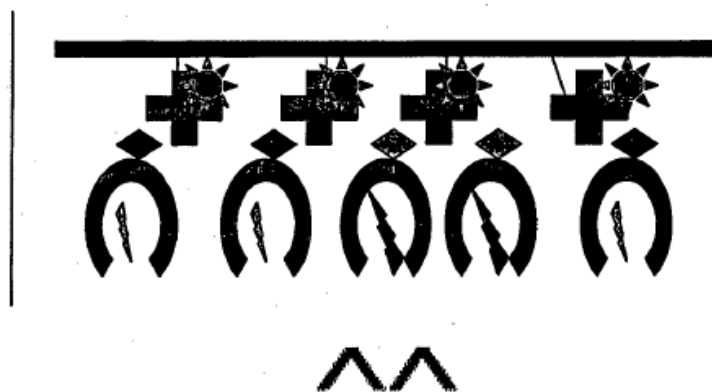


Figura 7

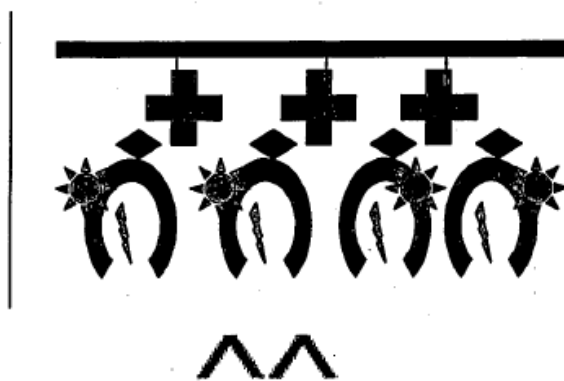


Figura 8

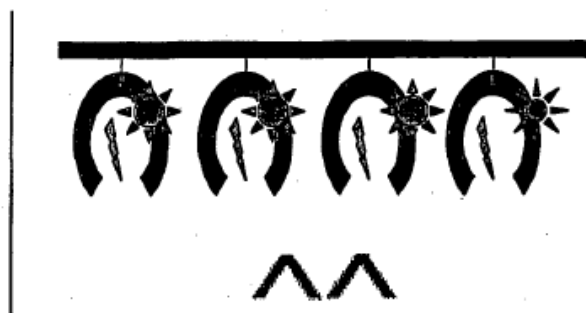


Figura 9

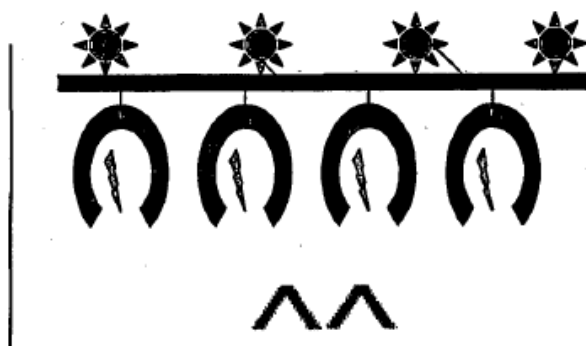


Figura 10

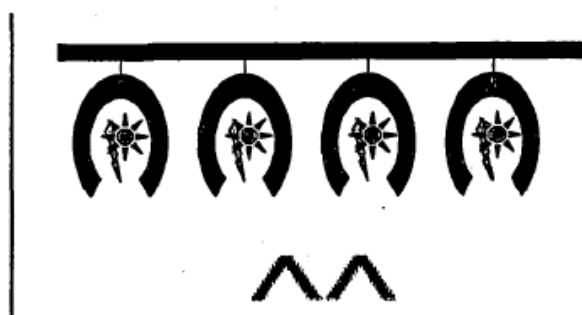


Figura 11

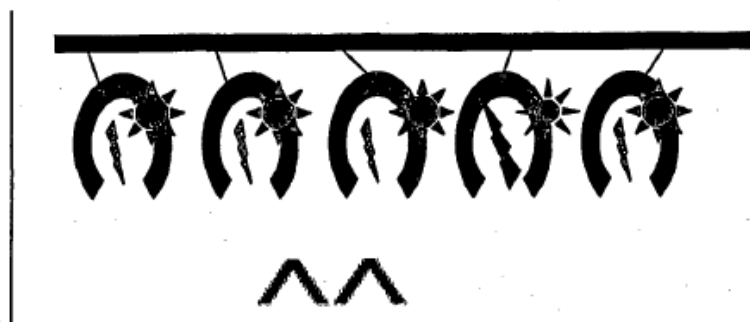


Figura 12

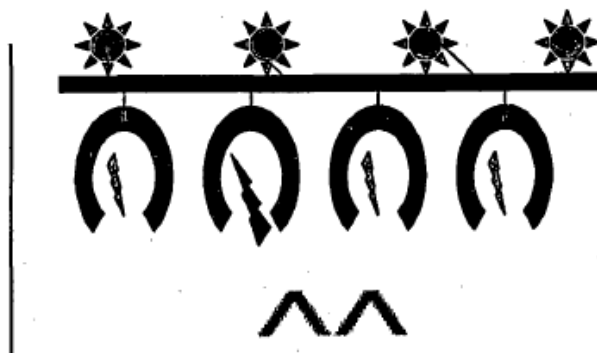


Figura 13

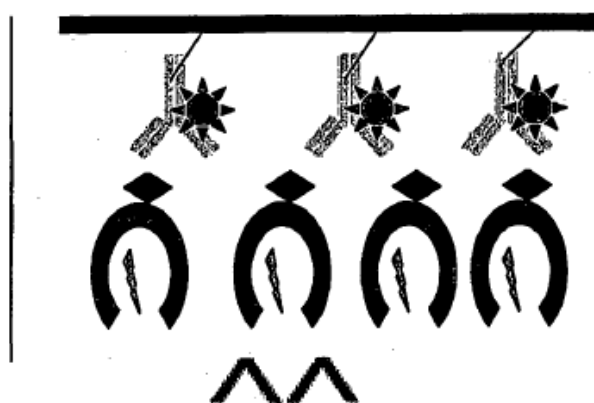


Figura 14

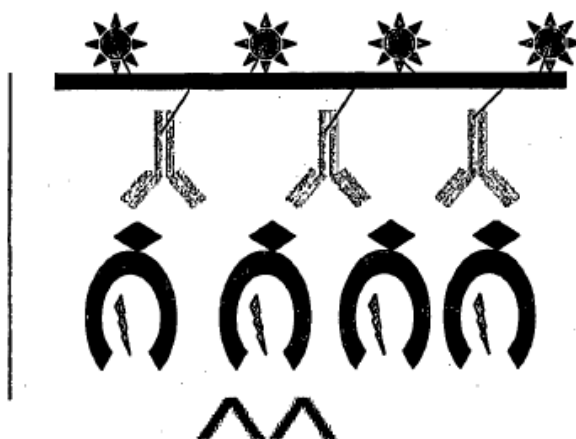


Figura 15

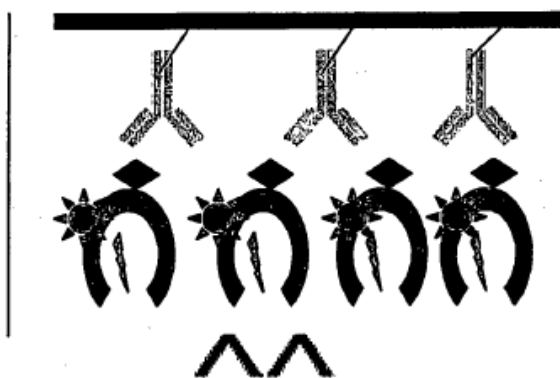


Figura 16

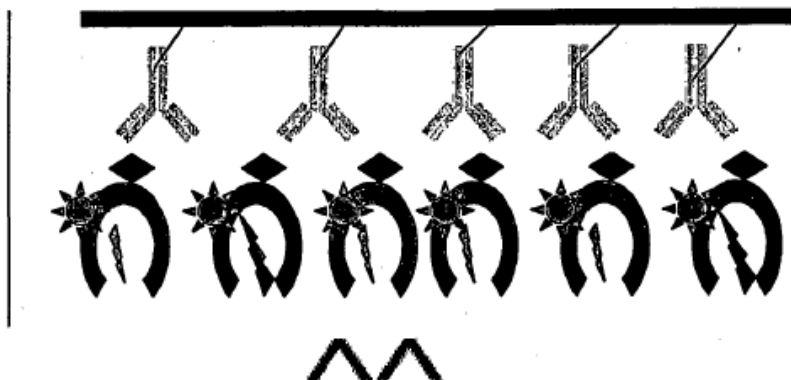


Figura 17

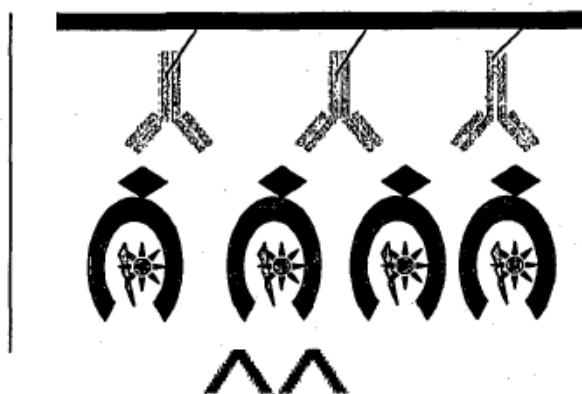


Figura 18

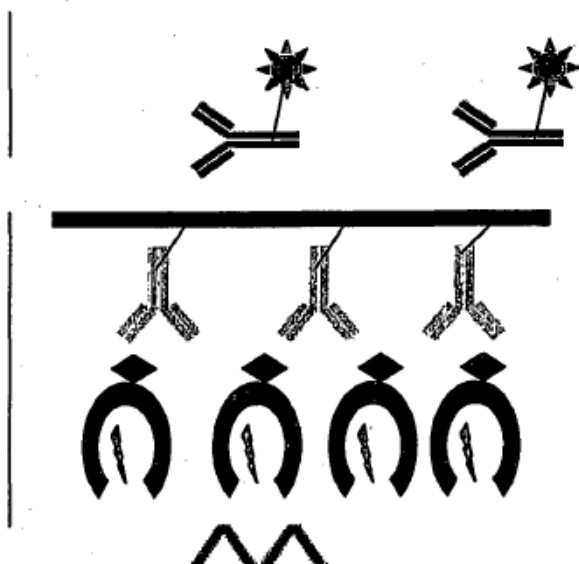


Figura 19

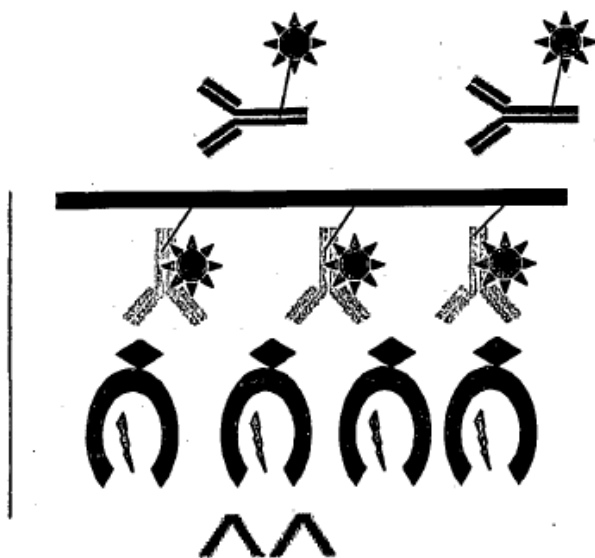


Figura 20

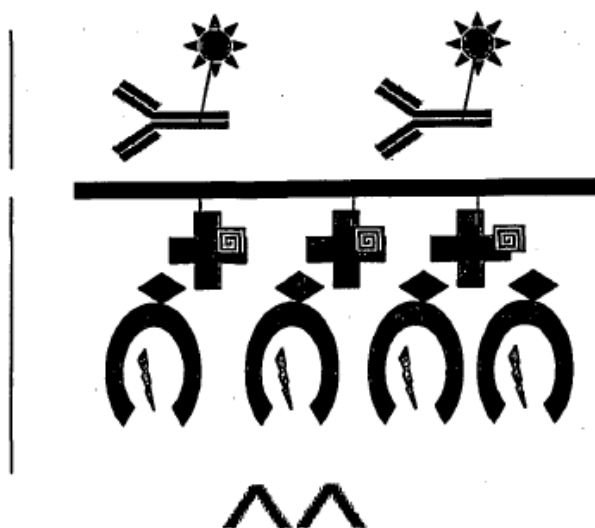


Figura 21

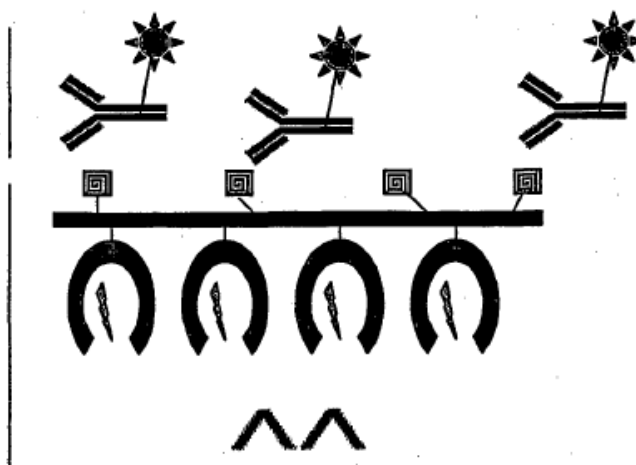


Figura 22

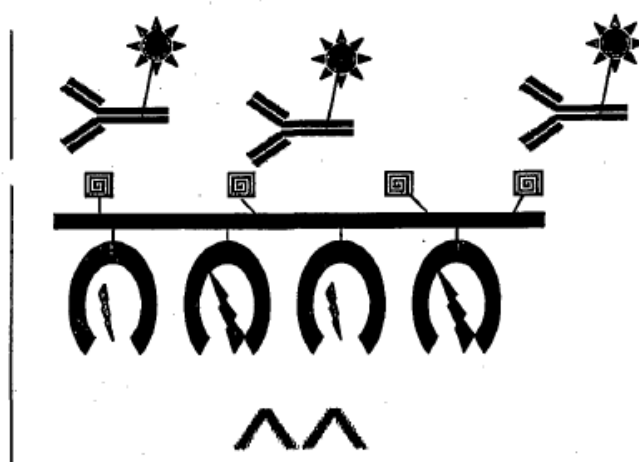


Figura 23

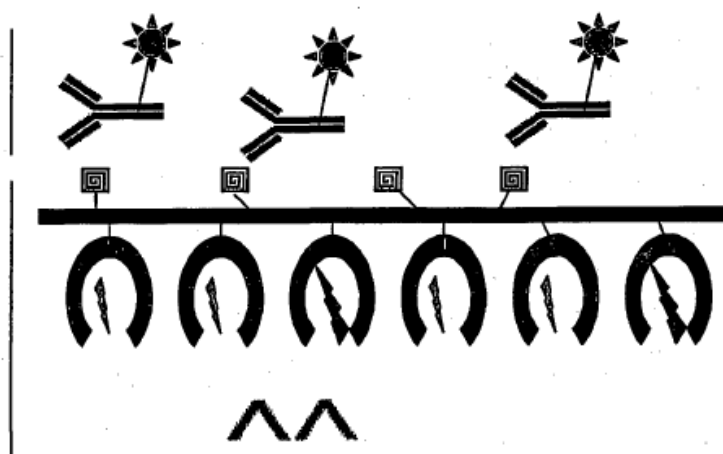


Figura 24

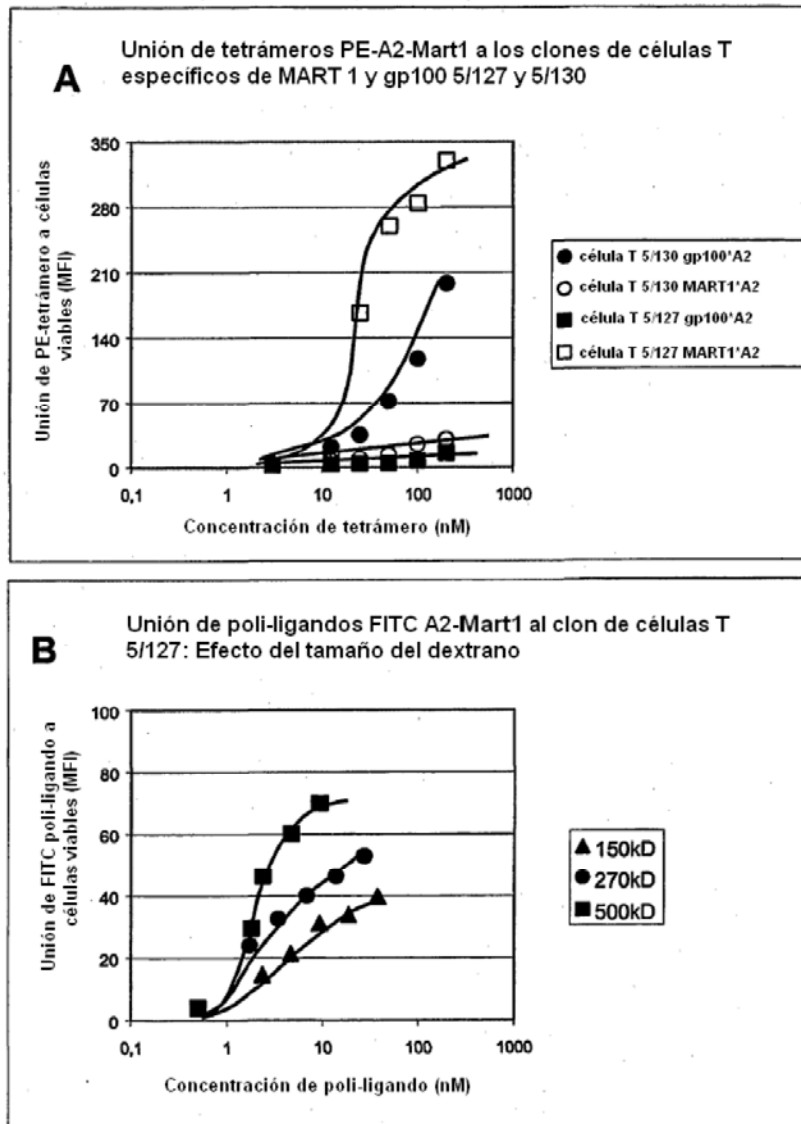


Figura 25

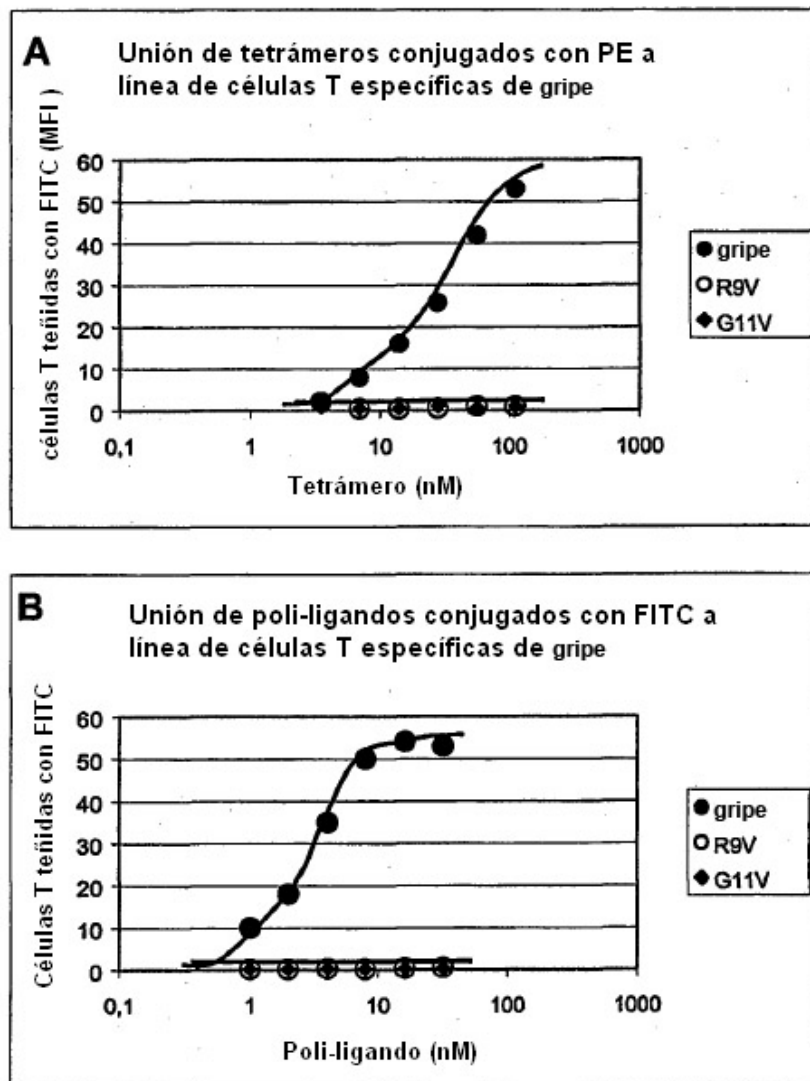


Figura 26

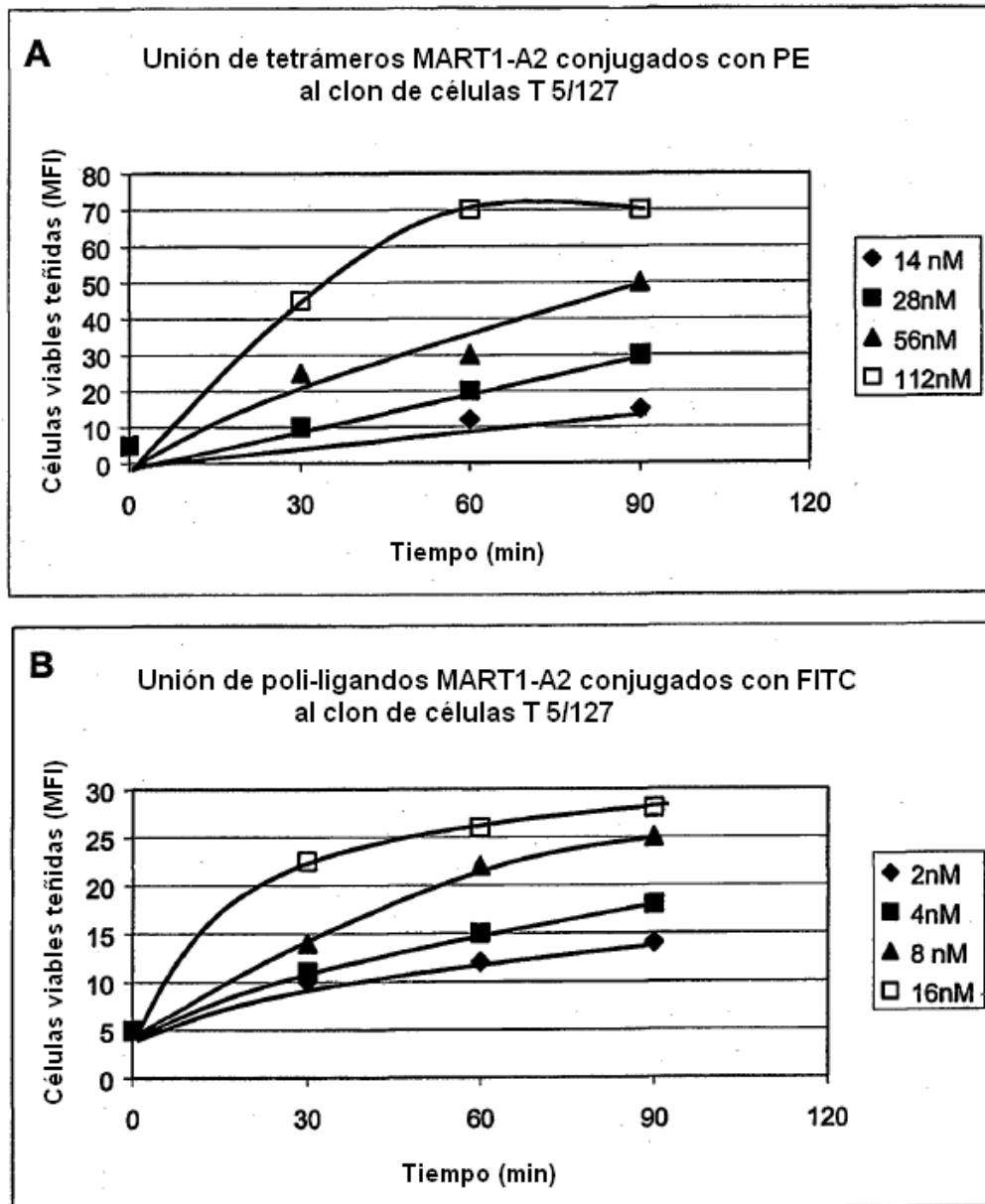


Figura 27

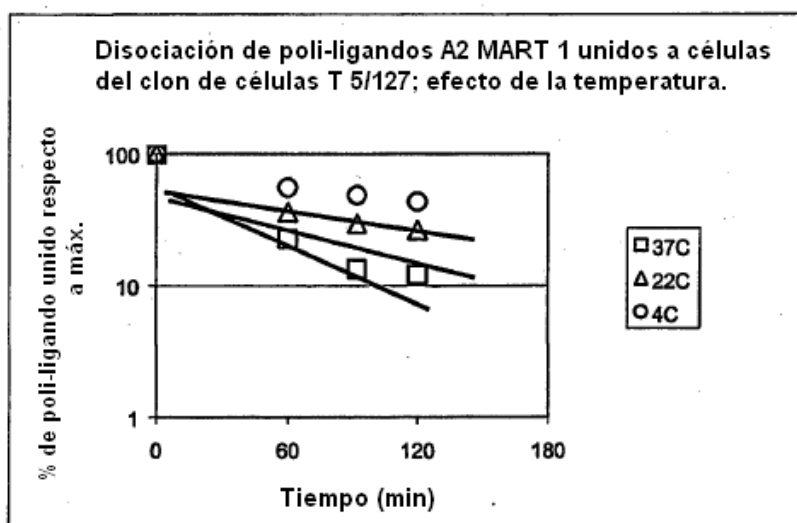


Figura 28

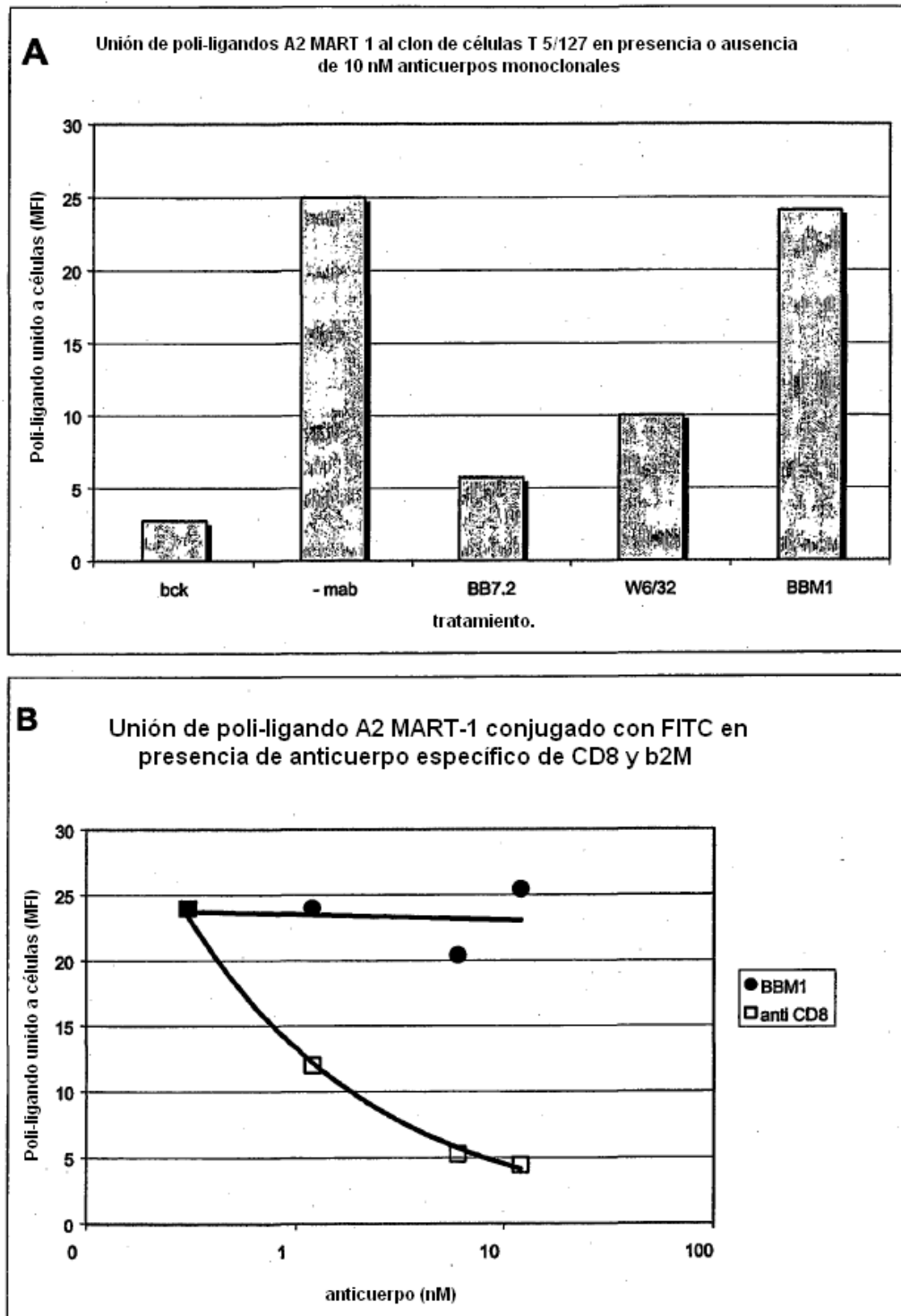


Figura 29

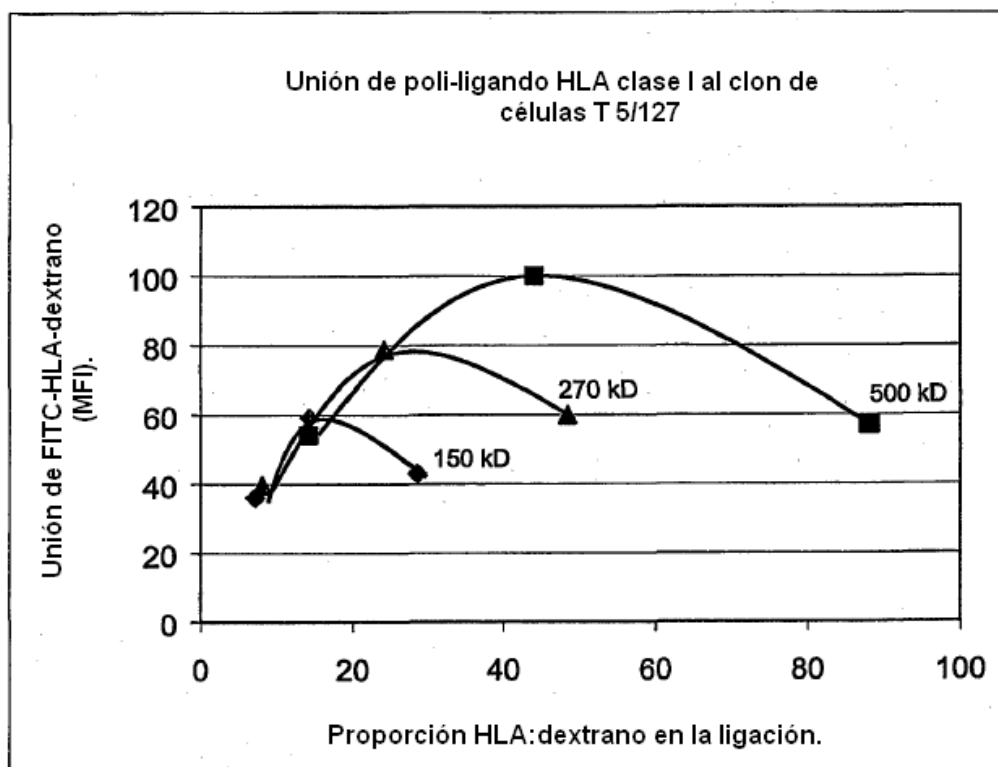
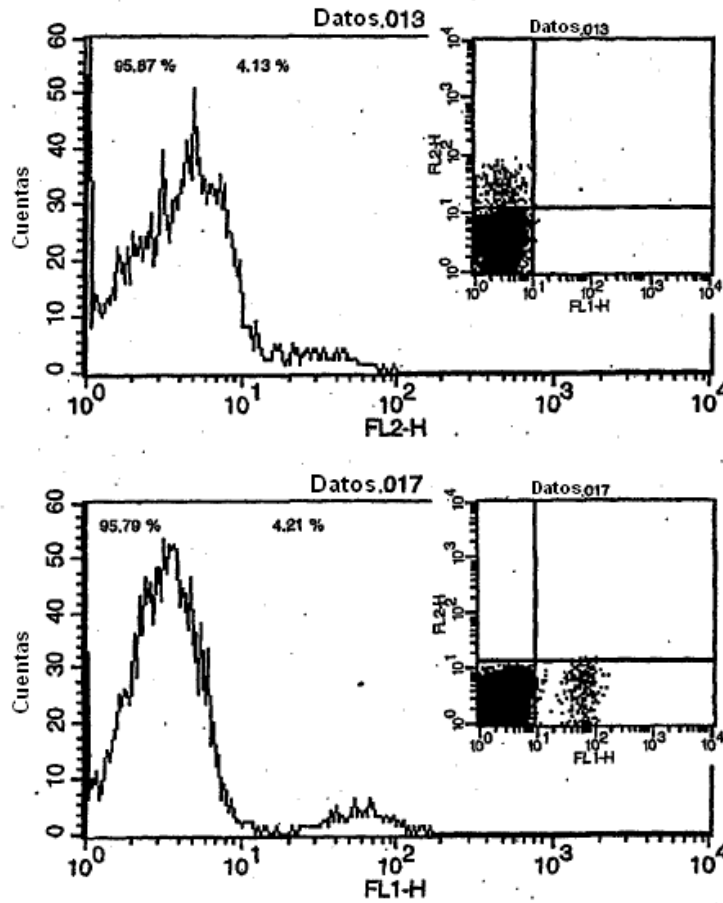


Figura 30

Análisis por citometría de flujo de subpoblación
de células T específica de Mart-1



A: Tinción con
proteína tetramero
Mart-1/HLA (15 nM)
(conjugada con PE).

B: Tinción con
proteína poli-ligando
Mart-1/HLA (3 nM)
(conjugada con FITC).

Figura 31

Análisis por citometría de flujo de células T específicas de Mart-1
(clon 5/127) y gp100 (clon 5/130)

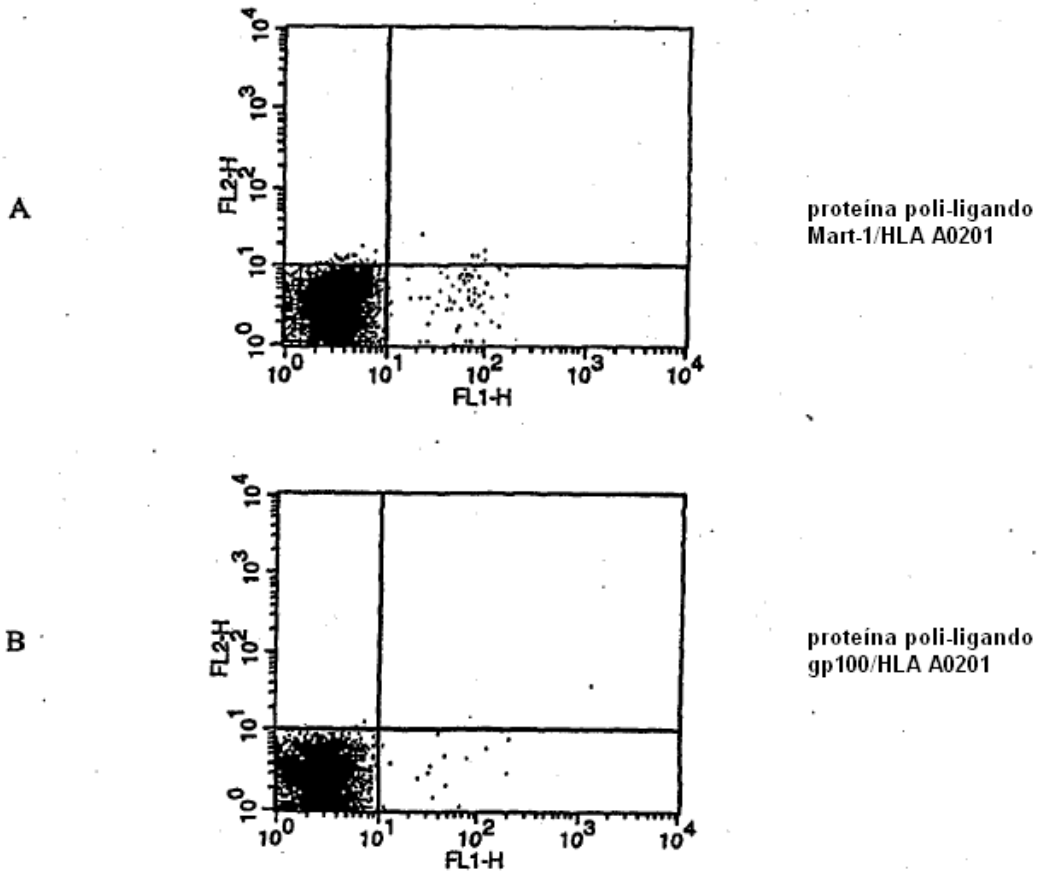


Figura 32

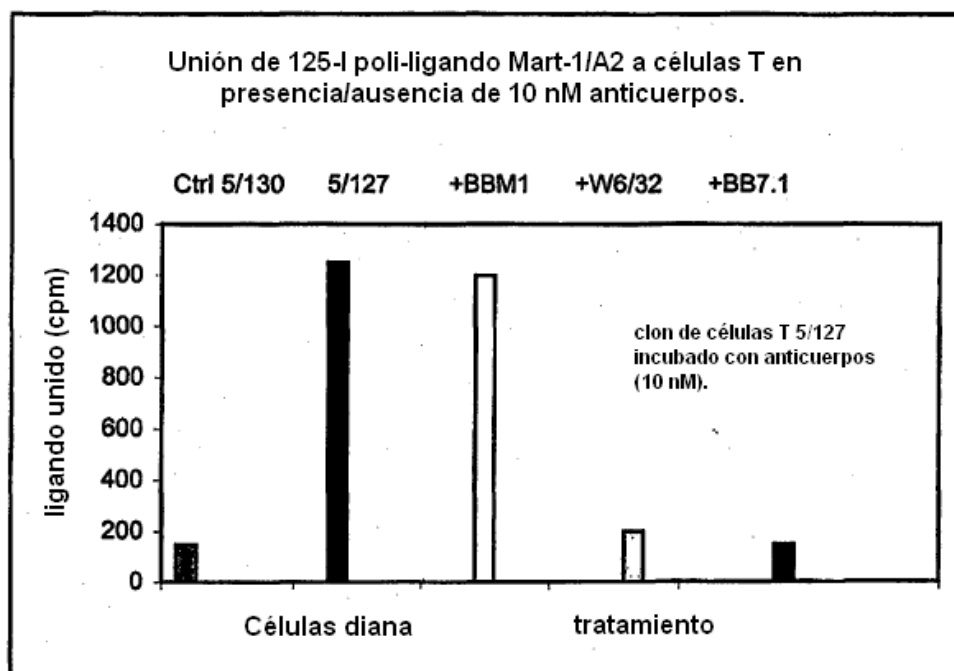


Figura 33

Figura 34

En la tabla, "X" indica aminoácidos variables.

Lista de Restos de Unión Interesantes de HLA Clase I y II				
#	Clase	Resto	Serotipo	Genotipo
1	Clase I	XX [DE] XXXXXX [Y]	A1	
2	Clase I	XX [DE] XXXXX [Y]	A1	
3	Clase I	XX [DE] XXXX [Y]	A1	
4	Clase I	XXXXXXXXXX [K]	A11	A*1101
5	Clase I	XXXXXXXX [K]	A11	A*1101
6	Clase I	XXXXXXXX [K]	A11	A*1101
7	Clase I	X [LM] XXXXXXXX [VL]	A2	A*0201
8	Clase I	X [LM] XXXXX [VL]	A2	A*0201
9	Clase I	X [LM] XXXXXX [VL]	A2	A*0201
10	Clase I	X [L] XXXXXX [LV]	A2	A*0202
11	Clase I	X [L] XXXXXXXX [LV]	A2	A*0202
12	Clase I	X [L] XXXXX [LV]	A2	A*0202
13	Clase I	X [L] XXXXXXXX [L]	A2	A*0204
14	Clase I	X [L] XXXXX [L]	A2	A*0204
15	Clase I	X [L] XXXXXXXX [L]	A2	A*0204
16	Clase I	X [VLIMQ] XXXXXX [L]	A2	A*0205
17	Clase I	X [VLIMQ] XXXXXXXX [L]	A2	A*0205
18	Clase I	X [VLIMQ] XXXXX [L]	A2	A*0205
19	Clase I	X [V] XXXXXXXX [V]	A2	A*0206
20	Clase I	X [V] XXXXX [V]	A2	A*0206
21	Clase I	X [V] XXXXXXXX [V]	A2	A*0206
22	Clase I	X [L] [D] XXXXXX [L]	A2	A*0207
23	Clase I	X [L] [D] XXXX [L]	A2	A*0207

24	Clase I	X [L] [D] XXXXX [L]	A2	A*0207
25	Clase I	X [VOL] XXXXXX [LV]	A2	A*0214
26	Clase I	X [VOL] XXXXXX [LV]	A2	A*0214
27	Clase I	X [VOL] XXXXX [LV]	A2	A*0214
28	Clase I	X [Y] XXXXXXX [ILF]	A24	
29	Clase I	X [Y] XXXXXXX [ILF]	A24	
30	Clase I	X [Y] XXXXX [ILF]	A24	
31	Clase I	X [E] XXXXXXX [Y]	A29	A*2902
32	Clase I	X [E] XXXXX [Y]	A29	A*2902
33	Clase I	X [E] XXXXXXX [Y]	A29	A*2902
34	Clase I	X [LVM] XXXXXXX [KYF]	A3	
35	Clase I	X [LVM] XXXXX [KYF]	A3	
36	Clase I	X [LVM] XXXXXX [KYF]	A3	
37	Clase I	XXXXXXXXX [R]	A31	A*3101
38	Clase I	XXXXXXXXXX [R]	A31	A*3101
39	Clase I	XXXXXXXXX [R]	A31	A*3101
40	Clase I	XXXXXXXXXX [R]	A33	A*3302
41	Clase I	XXXXXXXXXX [R]	A33	A*3302
42	Clase I	XXXXXXXXX [R]	A33	A*3302
43	Clase I	X [VT] XXXXX [RK]	A68	A*6801
44	Clase I	X [VT] XXXXXXX [RK]	A68	A*6801
45	Clase I	X [VT] XXXXXXX [RK]	A68	A*6801
46	Clase I	X [VTA] XXXXXX [VL]	A69	A*6901
47	Clase I	X [VTA] XXXXXXX [VL]	A69	A*6901
48	Clase I	X [VTA] XXXXX [VL]	A69	A*6901
49	Clase I	X [RK] XX [RH] XXX [L]	B14	
50	Clase I	X [RK] XX [RH] XX [L]	B14	
51	Clase I	X [RK] XX [RH] XXXX [L]	B14	
52	Clase I	X [R] XXXXXXXX	B27	

53	Class I	X[R] XXXXXX	B27	
54	Class I	X[R] XXXXXX	B27	
55	Class I	X[R] XXXXXX [FYILW]	B27	B*2702
56	Class I	X[R] XXXXX [FYILW]	B27	B*2702
57	Class I	X[R] XXXXXXX [FYILW]	B27	B*2702
58	Class I	X[R] XXXXXXX [LF]	B27	B*2705
59	Class I	X[R] XXXXXX [LF]	B27	B*2705
60	Class I	X[R] XXXXX [LF]	B27	B*2705
61	Class I	X[P] XXXXXXX [YFMLI]	B35	B*35
62	Class I	X[P] XXXXXX [YFMLI]	B35	B*35
63	Class I	X[P] XXXXX [YFMLI]	B35	B*35
64	Class I	X[P] XXXXXXX [YFMLI]	B35	B*3501
65	Class I	X[P] XXXXX [YFMLI]	B35	B*3501
66	Class I	X[P] XXXXXX [YFMLI]	B35	B*3501
67	Class I	X[P] XXXXX [M]	B35	B*3503
68	Class I	X[P] XXXXXXX [M]	B35	B*3503
69	Class I	X[P] XXXXXX [M]	B35	B*3503
70	Class I	X[DE] XXXXX [FML] [IL]	B37	B*3701
71	Class I	X[DE] XXXXXX [FML] [IL]	B37	B*3701
72	Class I	X[DE] XXXX [FML] [IL]	B37	B*3701
73	Class I	XXXXXXXXX [FL]	B38	B*3801
74	Class I	XXXXXXXXX [FL]	B38	B*3801
75	Class I	XXXXXXXX [FL]	B38	B*3801
76	Class I	X[RH] XXXXXXX [L]	B39	B*39011
77	Class I	X[RH] XXXXXX [L]	B39	B*39011
78	Class I	X[RH] XXXXX [L]	B39	B*39011
79	Class I	X[KQ] XXXXXX [L]	B39	B*3902
80	Class I	X[KQ] XXXXXXX [L]	B39	B*3902
81	Class I	X[KQ] XXXXX [L]	B39	B*3902

82	Class I	X[E] XXXXXXXX [L]	B40	
83	Class I	X[E] XXXXX [L]	B40	
84	Class I	X[E] XXXXXXX [L]	B40	
85	Class I	X[E] XXXXXXXX [Y]	B44	
86	Class I	X[E] XXXXX [Y]	B44	
87	Class I	X[E] XXXXXXX [Y]	B44	
88	Class I	X[E] XXXXX [FY]	B44	B*4402
89	Class I	X[E] XXXXXXXX [FY]	B44	B*4402
90	Class I	X[E] XXXXXXX [FY]	B44	B*4402
91	Class I	X[E] XXXXX [YF]	B44	B*4403
92	Class I	X[E] XXXXXXXX [YF]	B44	B*4403
93	Class I	X[E] XXXXXXX [YF]	B44	B*4403
94	Class I	X[M] XXXXXXXX [YF]	B46	B*4601
95	Class I	X[M] XXXXXXX [YF]	B46	B*4601
96	Class I	X[M] XXXXX [YF]	B46	B*4601
97	Class I	X[APG] XXXXX [FI]	B51	B*5101
98	Class I	X[APG] XXXXXXX [FI]	B51	B*5101
99	Class I	X[APG] XXXXXXXX [FI]	B51	B*5101
100	Class I	X[PAG] XXXXXXX [IV]	B51	B*5102
101	Class I	X[PAG] XXXXXXXX [IV]	B51	B*5102
102	Class I	X[PAG] XXXXX [IV]	B51	B*5102
103	Class I	X[APG] XXXXXXX [VIF]	B51	B*5103
104	Class I	X[APG] XXXXX [VIF]	B51	B*5103
105	Class I	X[APG] XXXXXXXX [VIF]	B51	B*5103
106	Class I	XXXXXXX [IV] [IV]	B52	B*5201
107	Class I	XXXXXXX [IV] [IV]	B52	B*5201
108	Class I	XXXXXXXXX [IV] [IV]	B52	B*5201
109	Class I	X[P] XXXXXXX [LIVMY]	B53	B*5301
110	Class I	X[P] XXXXX [LIVMY]	B53	B*5301

111	Class I	X[P] XXXXXXXX [LIVMY]	B53	B*5301
112	Class I	X[P] XXXXXXXX	B54	B*5401
113	Class I	X[P] XXXXXXXX	B54	B*5401
114	Class I	X[P] XXXXXXXX	B54	B*5401
115	Class I	X[P] XXXXXXXX	B55	B*5501
116	Class I	X[P] XXXXXXXX	B55	B*5501
117	Class I	X[P] XXXXXXXX	B55	B*5501
118	Class I	X[P] XXXXXXXX	B55	B*5502
119	Class I	X[P] XXXXXXXX	B55	B*5502
120	Class I	X[P] XXXXXXXX	B55	B*5502
121	Class I	X[P] XXXXXXXX [A]	B56	B*5601
122	Class I	X[P] XXXXXXXX [A]	B56	B*5601
123	Class I	X[P] XXXXXXXX [A]	B56	B*5601
124	Class I	X[AST] XXXXXXXX [FW]	B58	B*5801
125	Class I	X[AST] XXXXXXXX [FW]	B58	B*5801
126	Class I	X[AST] XXXXXXXX [FW]	B58	B*5801
127	Class I	X[E] XXXXXXXX [L]	B60	B*40012
128	Class I	X[E] XXXXXXXX [L]	B60	B*40012
129	Class I	X[E] XXXXXXXX [L]	B60	B*40012
130	Class I	X[E] XXXXXXXX [V]	B61	B*4006
131	Class I	X[E] XXXXXXXX [V]	B61	B*4006
132	Class I	X[E] XXXXXXXX [V]	B61	B*4006
133	Class I	X[QL] XXXXXXXX [FY]	B62	B*1501
134	Class I	X[QL] XXXXXXXX [FY]	B62	B*1501
135	Class I	X[QL] XXXXXXXX [FY]	B62	B*1501
136	Class I	X[P] XXXXXXXX [L]	B67	B*6701
137	Class I	X[P] XXXXXXXX [L]	B67	B*6701
138	Class I	X[P] XXXXXXXX [L]	B67	B*6701
139	Class I	X[P] XXXXXXXX [LF]	B7	

140	Class I	X [P] XXXXX [LF]	B7	
141	Class I	X [P] XXXXXXX [LF]	B7	
142	Class I	X [P] XXXXXX [L]	B7	B*0702
143	Class I	X [P] XXXXX [L]	B7	B*0702
144	Class I	X [P] XXXXXXX [L]	B7	B*0702
145	Class I	X [P] XXXXXXX [L]	B7	B*0703
146	Class I	X [P] XXXXX [L]	B7	B*0703
147	Class I	X [P] XXXXXXX [L]	B7	B*0703
148	Class I	X [P] XXXXXXX [L]	B7	B*0705
149	Class I	X [P] XXXXXXX [L]	B7	B*0705
150	Class I	X [P] XXXXX [L]	B7	B*0705
151	Class I	X [R] XXXXX [P]	B73	B*7301
152	Class I	X [R] XXXXXXX [P]	B73	B*7301
153	Class I	X [R] XXXXXXX [P]	B73	B*7301
154	Class I	X [PAG] XXXXXXX	B78	B*7801
155	Class I	X [PAG] XXXXXXX	B78	B*7801
156	Class I	X [PAG] XXXXXXX	B78	B*7801
157	Class I	XX [K] X [KR] XX [L]	B8	
158	Class I	XX [K] X [KR] XXXX [L]	B8	
159	Class I	XX [K] X [KR] XXX [L]	B8	
160	Class I	X [YPF] XXXXXXX [LF]	C4	Cw*0401
161	Class I	X [YPF] XXXXXXX [LF]	C4	Cw*0401
162	Class I	X [YPF] XXXXX [LF]	C4	Cw*0401
163	Class I	X [AL] XXXXXX [L]	Cw1	Cw*0102
164	Class I	X [AL] XXXXXXX [L]	Cw1	Cw*0102
165	Class I	X [AL] XXXXX [L]	Cw1	Cw*0102
166	Class I	X [A] XXXXXXX [LM]	Cw10	Cw*0304
167	Class I	X [A] XXXXX [LM]	Cw10	Cw*0304
168	Class I	X [A] XXXXXXX [LM]	Cw10	Cw*0304

169	Class I	XXXXXXXXXX [LFMI]	Cw3	Cw*0301
170	Class I	XXXXXXXXXX [LFMI]	Cw3	Cw*0301
171	Class I	XXXXXXXXXX [LFMI]	Cw3	Cw*0301
172	Class I	XXXXXXXXXX [LIVF]	Cw6	Cw*0601
173	Class I	XXXXXXXXXX [LIVF]	Cw6	Cw*0601
174	Class I	XXXXXXXXXX [LIVF]	Cw6	Cw*0601
175	Class I	XXXXXXXXXX [LIVF]	Cw6	Cw*0602
176	Class I	XXXXXXXXXX [LIVF]	Cw6	Cw*0602
177	Class I	XXXXXXXXXX [LIVF]	Cw6	Cw*0602
178	Class I	XXXXXXXXXX [YFL]	Cw7	Cw*0702
179	Class I	XXXXXXXXXX [YFL]	Cw7	Cw*0702
180	Class I	XXXXXXXXXX [YFL]	Cw7	Cw*0702
181	Class II	[MV] XXX [MY] XX [MV] X	DPA1*0102	DPA1*0102
182	Class II	[WY] XXXXXXXX	DPA1*0102	DPA1*0102
183	Class II	[FL] XXX [FL] XX [IA] X	DPA1*0102	DPA1*0102
184	Class II	XXXXXXXXXX [L]	DPA1*0201	DPA1*0201
185	Class II	[A] XXXXX [A] XXX	DPA1*0201	DPA1*0201
186	Class II	[WY] XXXXXXXX	DPB1*0201	DPB1*0201
187	Class II	[MV] XXX [MY] XX [MV] X	DPB1*0201	DPB1*0201
188	Class II	[FL] XXX [FL] XX [IA] X	DPB1*0201	DPB1*0201
189	Class II	[A] XXXXX [A] XXX	DPw4	DPB1*0401
190	Class II	XXXXXXXXXX [L]	DPw4	DPB1*0401
191	Class II	XXX [I] XXXXX	DQ2	DQB1*0201
192	Class II	XXXXXXXXXX [M]	DQ2	DQB1*0201
193	Class II	XXXXX [E] XXX	DQ2	DQB1*0201
194	Class II	XXXX [Y] XXXX	DQ7	DQB1*0301
195	Class II	XXXXXXXXXX [M]	DQA1*0501	DQA1*0501
196	Class II	XXX [I] XXXXX	DQA1*0501	DQA1*0501
197	Class II	XXXX [Y] XXXX	DQA1*0501	DQA1*0501

198	Clase II	XXXXX [E] XXX	DQA1*0501	DQA1*0501
199	Clase II	XXXXX [P] XXX	DR1	DRB1*0101
200	Clase II	XXX [Q] XXXX [Y]	DR1	DRB1*0101
201	Clase II	XXXXX [P] XXX	DR1	DRB1*0102
202	Clase II	XXX [M] XXXXX	DR1	DRB1*0102
203	Clase II	[F] XXXX [H] XXX	DR11	DRB1*1101
204	Clase II	[V] XXXXXXXX	DR11	DRB1*1104
205	Clase II	[L] XX [M] XXXXX	DR11	DRB1*1104
206	Clase II	[I] XXXX [R] XXX	DR11	DRB1*1104
207	Clase II	[V] X [A] XXXXX [V]	DR12	DRB1*1201
208	Clase II	[IL] XX [L] X [R] XX [Y]	DR13	DRB1*1301
209	Clase II	[V] XX [V] X [R] XX [F]	DR13	DRB1*1301
210	Clase II	XXX [M] XXXX [A]	DR13	DRB1*1301
211	Clase II	XXX [A] XXXX [S]	DR13	DRB1*1301
212	Clase II	XXX [W] XXXX [T]	DR13	DRB1*1301
213	Clase II	XXX [Y] XXXXX	DR13	DRB1*1301
214	Clase II	XXXXX [R] XXX	DR13	DRB1*1302
215	Clase II	[I] XX [W] XXXXX	DR13	DRB1*1302
216	Clase II	[A] XX [A] XXXX [T]	DR13	DRB1*1302
217	Clase II	[V] XX [M] X [R] XXX	DR13	DRB1*1302
218	Clase II	XXX [Y] XXXXX	DR13	DRB1*1302
219	Clase II	[I] XX [I] XX [V] XX	DR15	DRB1*1501
220	Clase II	[L] XX [F] XX [I] XX	DR15	DRB1*1501
221	Clase II	XXXXXX [F] XX	DR15	DRB1*1501
222	Clase II	[V] XX [Y] XX [L] XX	DR15	DRB1*1501
223	Clase II	XXXXXX [M] XX	DR15	DRB1*1501
224	Clase II	XXXXXXXX [F]	DR17	DRB1*0301
225	Clase II	[V] XXXX [N] XXX	DR17	DRB1*0301
226	Clase II	XXX [D] XXXXX	DR17	DRB1*0301

227	Clase II	[M] XXXXXXXX	DR4	DRB1*0401
228	Clase II	XXXXXXXX[K]	DR4	DRB1*0401
229	Clase II	XXX[M] XXXX	DR4	DRB1*0402
230	Clase II	XXXXX[K] XX[H]	DR4	DRB1*0402
231	Clase II	XXX[W] XXXX	DR4	DRB1*0402
232	Clase II	XXXXX[R] XX[K]	DR4	DRB1*0404
233	Clase II	[M] XXXXXXXX	DR4	DRB1*0405
234	Clase II	[W] XX[VK] X[DS] XX[N]	DR4	DRB1*0407
235	Clase II	[FY] XX[A] X[NT] XX[Q]	DR4	DRB1*0407
236	Clase II	XXX[N] XXXX	DR52	DRB3*0202
237	Clase II	XXXXXXXX[V]	DR52	DRB3*0301
238	Clase II	[IL] XX[N] X[AS] XX[IL]	DR52	DRB3*0301
239	Clase II	XXX[S] XXXX	DR9	DRB1*0901

Figura 35

Proteínas VIH/SIV (fuente <http://hiv-web.lanl.gov/immunology/-index.html>)

Nombre	Tamaño	Función
Gag MA	p17	anclaje a membrana, interacción env
CA	p24	núcleo de cápside virión
NC	p7	nucleocápside, une ARN virión Vpr virión
Proteasa (RP)	p15	gag/pol escisión y maduración virión
Transcriptasa inversa (RT)	p66	p51 transcripción inversa virión
Env	pg120/gp41	glicoproteínas virales externas se unen a CD4 y quimioquina co-receptores membrana plasmática
Tat	p16/p14	transactivador transcripcional viral
Rev	p19	transporte, estabilidad y fact utilización ARN
Nef	p27-p25	regulación a la baja CD4 y MHC Clase I
Vpx	p12-16	homólogo Vpr? Presente en VIH-2
Tev	p28	Proteína tripartita tat-env-rec

Figura 36

Antígenos asociados a tumor reconocidos por linfocitos T (fuente: Sociedad de Cáncer Danesa)

Proteínas sobre-expresadas en tumores

p53, WT1, HER-2/neu, alfa fetoproteína, MUC-1, MUC-2, telomerasa, survivina, FBP

Proteínas víricas

Proteínas HPV (E6 y E7), EBV (LPM2)

Proteínas mutadas, únicas o expresadas aberrantemente

CDK-4, P21 ras, MUM-1, MUM-2, MUM-3 (helicasa), beta-catenina, NA17-A/Gnt-V, p15, pg100-in4, caspasa-8, hsp70-2, factor de elongación 2, HLA-A2 mutada, miosina clase I, carboxil esterasa intestinal, proteína de fusión BCR-ABL, idiotype

Antígenos de diferenciación específicos de linaje

Próstata: PSA, PSMA, PAP

Melanoma: tirosinasa, gp100, MART-1, TRP-1, TRP-2, MC1R

Antígenos cáncer/testículos

Familia MAGE-A: MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12

Familia MAGE-B: MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B6

Familia GAGE: GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7B, GAGE-8

Familia LAGE: LAGE-1a, LAGE-1b, NY-ESO-1

Miembros separados: BAGE, PRAME (MAPE), SART-1, SART-3, ART-4

Figura 37

Epitopos VIH CTL mejor definidos (fuente <http://hiv-web.lanl.gov/immunology/index.html>)

HLA	Proteína	AA	Aislado	Secuencia
HLA-A2	p17	77-85	LAI	SLYNTVATL
	Johnson91			
	Parker92			
	Parker94			
	RT	33-41	LAI	ALVEICTEM
	RT	346-354	LAI	VIYQYMDL
	Walker89			
	Tsomides91			
A*0201	gp120	311-320	III-B	RGPGRAFVTI
	gp41	818-827	LAI	SLLNATDIAV
	nef	136-145	LAI	PLTFGWCYKL
	nef	180-189	LAI	VLEWRFSRL
HLA-A3.1	p17	18-26	LAI	KIRLRPGGK
	p17	20-28	LAI	RLRPGGKKK
	p17	20-29	LAI	RLRPGGKKKY
	RT	33-43	LAI	ALVEICTEMEK
	RT	325-333	LAI	AIFQSSMTK
	gp120	37-46	LAI	TVYYGVPVWK
	gp41	775-785	LAI	RLRDLLIVTR
	nef	73-82	LAI	QVPLRPMTYK
HLA-A11	p17	84-92	LAI	TLYVCHQRI
	p24	349-359	III-B	ACQGVGGPGGHK
	RT	325-333	LAI	AIFQSSMTK
	RT	508-517	LAI	PLRPMTYK

	nef	75-82	LAI	PLRPMTYK
	nef	84-82	LAI	AVDLSHFLK
HLA-A19				
A*7401	RT	71-79	Clade A/B/D	ITLWQRPLV
HLA-A24				
	p17	28-36	LAI	KYKLKHIVW
	p24	296-306	HIL-1 Clade A	RDYVDRFFKTL
	gp120	53-62	LAI	LFCASDAKAY
	gp41	591-598	LAI	YLKDQQLL
	nef	138-147	LAI	RYPLTFGW
HLA-A25				
	p24	145-155	LAI	QAISPRTLNAW
	p24	203-212	LAI	ETINEEAAEW
HLA-A26				
	p24	167-175	LAI	EVIPMFSAI
	RT	593-603	LAI	ETFYVDGAANR
HLA-A28				
A*6802	RT	71-79	Clade A/B/D	ITLWQRPLV
A*6802	RT	85-93	Clade D	DTVLEEMNL
HLA-A29				
	gp120	376-384	LAI	FNCGGEFFY
HLA-A31				
	gp41	775-785	LAI	RLRDLILLIVTR
HLA-A32				
	RT	559-568	LAI	PIQKETWETW
	gp120	419-427	HXB2	RIKQIINMW
HLA-B7				
	p24	148-156	LAI	SPRTLNAWV
	p24	179-187	LAI	ATPQDLNTM
	RT	323-332	LAI	SPAIFQSSMT

	gp120	303-312	LAI	RPNNNTRKSI
	gp41	843-851	LAI	IPRRIRQGL
	nef	68-77	LAI	FPVTPQVPLR
	nef	77-85	LAI	RPMTYKAAL
	nef	128-137	LAI	TPGPGVRYPL
HLA-B8				
	p17	24-31	LAI	GGKKKYKL
	p17	74-82	lai	ELRSLYNTV
	p24	260-267	LAI	EIYKRWII
	gp120	2-10	III-B	RVKEYQHL
	gp41	591-598	LAI	YLKDQQL
	Johnson92			
	Shankar96			
	nef	13-20	LAI	WPTVRERM
	nef	90-97	LAI	FLKEKGGL
	Culmann- Peciolelli94			
	Price97			
HLA-B14				
	p24	298-306	LAI	DRFYKTLRA
	gp41	589-597	LAI	ERYLKDQQL
HLA-B15				
	gp120	375-383	LAI	SFNCGGEFF
HLA-B18				
	p24	293-302	HIV-1 Clade B/D	FRDYVDRFYK
	nef	135-143	LAI	YPLTFGWCY
HLA-B27				
	p17	18-27	LAI	KIRLRPGGKK
	p17	19-27	LAI	IRLRPGGKK
	p24	263-272	LAI	KRWIILGLNK
	Nixon88, Buseyne93			
	gp41	590-597	LAI	RYLKDQQL

	gp41	791-799	LAI	GRRGWEALKY
HLA-B*2703				
	p24	265-274	HIV-2	RRWIQLGLQK
B*2705	nef	105-114	LAI	RRQDILDLIWI
	nef	73-82	LAI	QVPLRPMTYK
	nef	134-141	LAI	RYPLTFGW
HLA-B35				
	p17	124-132	JH31	NSSKVSQNY
	p17	36-44	LAI	WASRELERF
	p24	254-262	U455	PPIPVGDIY
	RT	262-270	LAI	TVLDVGDAY
	RT	273-282	III-B	VPLDEDFRKY
	Sipsas97, Shiga96			
	RT	328-336	III-B	HPDIVIYQY
	gp120	42-52	LAI	VPVWKEATTTL
	gp41	611-619	LAI	TAVPWNASW
	nef	74-81	LAI	VPLRPMTY
	Culmann91, Culmann- Penciolelli94			
	gag	245-253	HIV-2	NPVPVGNIY
HLA-B37				
	nef	120-128	LAI	YFPDWQNYT
HLA-B29				
	p24	193-201	LAI	GHQAAMQML
HLA-B42				
	p17	20-29	LAI	RLRPGGKKY
	RT	438-446	LAI	YPGIKVRQL
HLA-B44				
	p17	306-316	SF2	AEQASQDVKNW
	gp120	30-38	SF33	AENLWVTY
HLA-B*4402				

	p24	294-304	HIV-1 Clade B	RDYVDRFYKTL
HLA-B45	RT	591-600	LAI	GAETFYVDGA
HLA-B51	p24	325-333	LAI	NANPDCKTI
	RT	42-50	LAI	EKEGKISKI
	RT	295-302	III-B	TAFTIPSI
	gp41	557-565	III-B	RAIEAQOHL
HLA-B52	p24	275-282	LAI	RMYSPTSI
HLA-B53	HIV-2 gag	173-181	HIV-2	TPYDINQML
HLA-B55	gp120	42-51	LAI	VPVWKEATTT
HLA-B57	p24	147-1555	III-B	ISPRTLNAW
	Johnson91, Goulder96			
	p24	140-149	LAI	TSTLQEQIGW
	p24	162-172	LAI	KAFSPVIPMF
	p24	240-249	LAI	TSTLQEQIGW
	p24	311-319	LAI	QASQEVKNW
	p24	311-319	LAI	QASQDVKNW
	nef	116-125	LAI	HTQGYFPDWQ
	nef	120-128	LAI	YFPDWQNYT
HLA-B58	p24	240-249	LAI	TSTLQEQIGW
HLA-B60	p17	240-249	LAI	TSTLQEQIGW
HLA-Bw62	p17	20-29	LAI	RLRPGGKKKY
	p24	268-277	LAI	LGLNKIVRMY

	RT	415-426	III-B	LVGKLNWASQIY
	RT	476-485	LAI	ILKEPVHGVY
	nef	84-91	LAI	AVDLSHFL
	Culmann- Peniolelli94			
	nef	117-127	LAI	TQGYFPDWQNY
HLA-Cw*01,02				
	p24	168-175	LAI	VIPMFSAL
HLA-Cw4				
	gp120	380-388	LAI	SFNCGGEFF

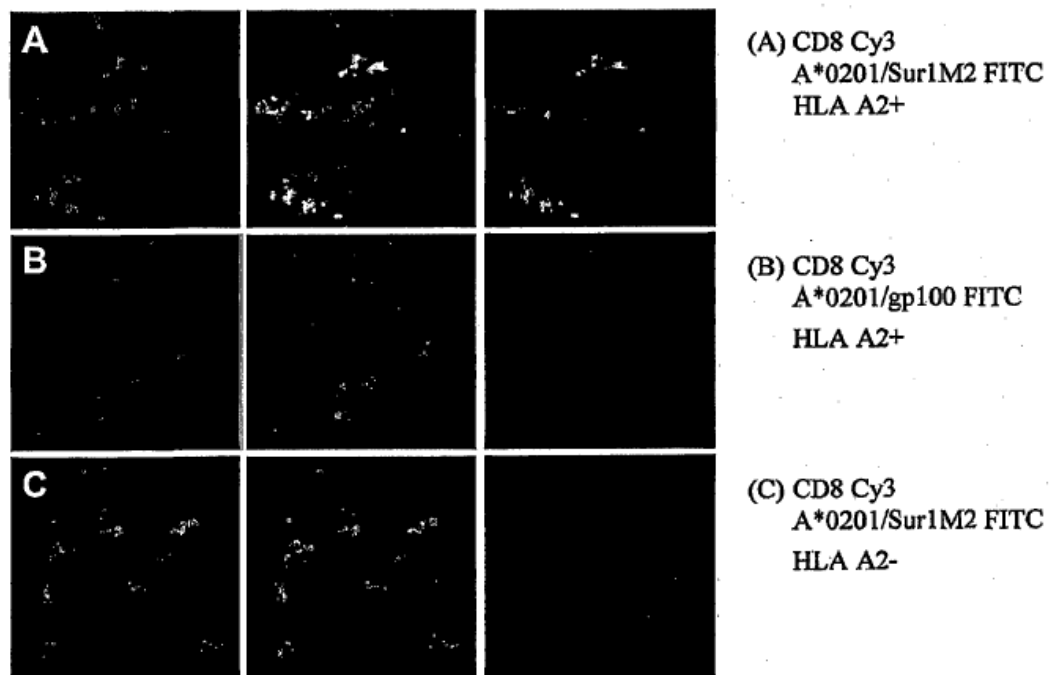


Figura 38

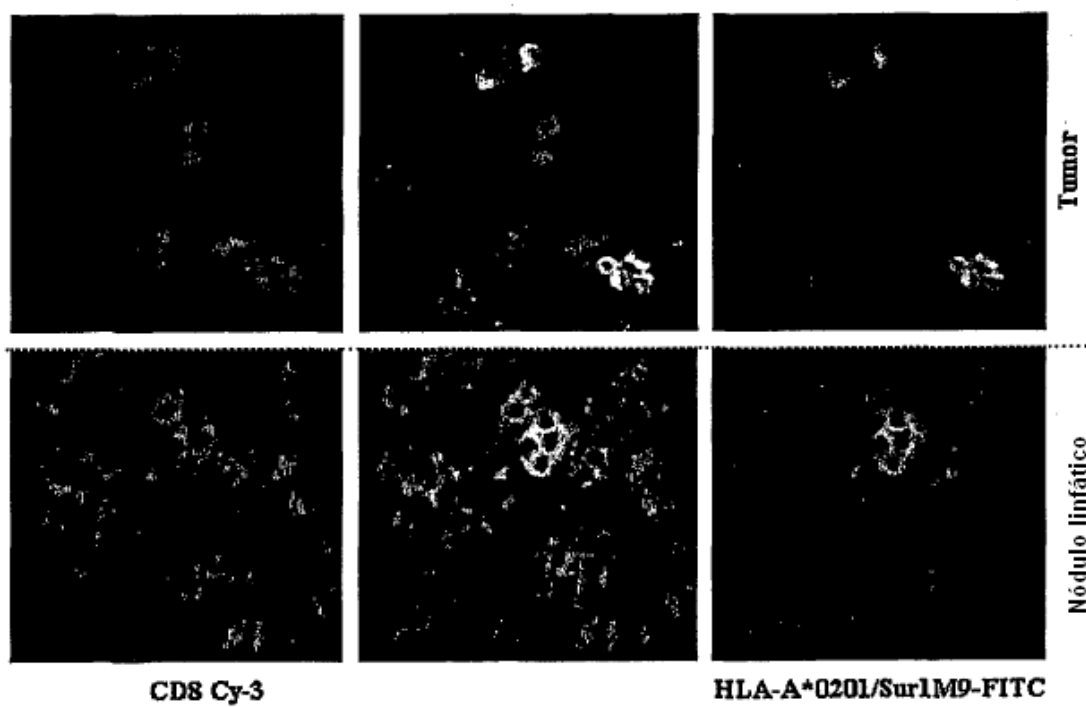


Figura 39

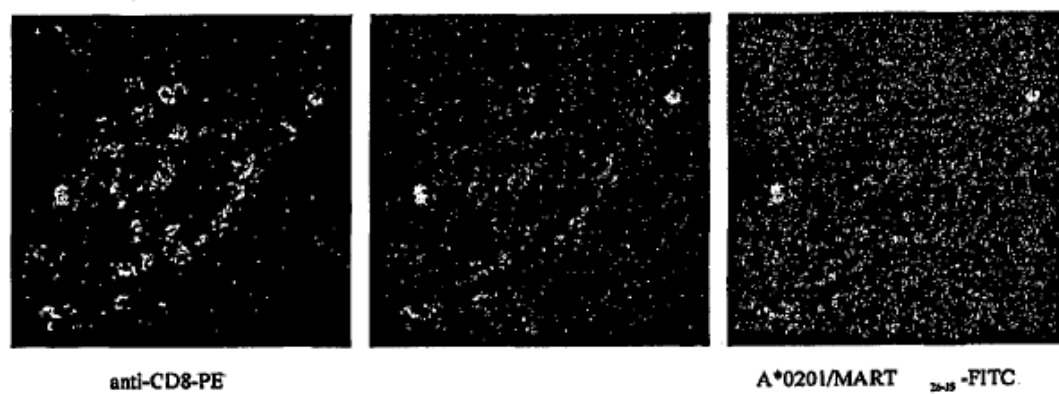


Figura 40

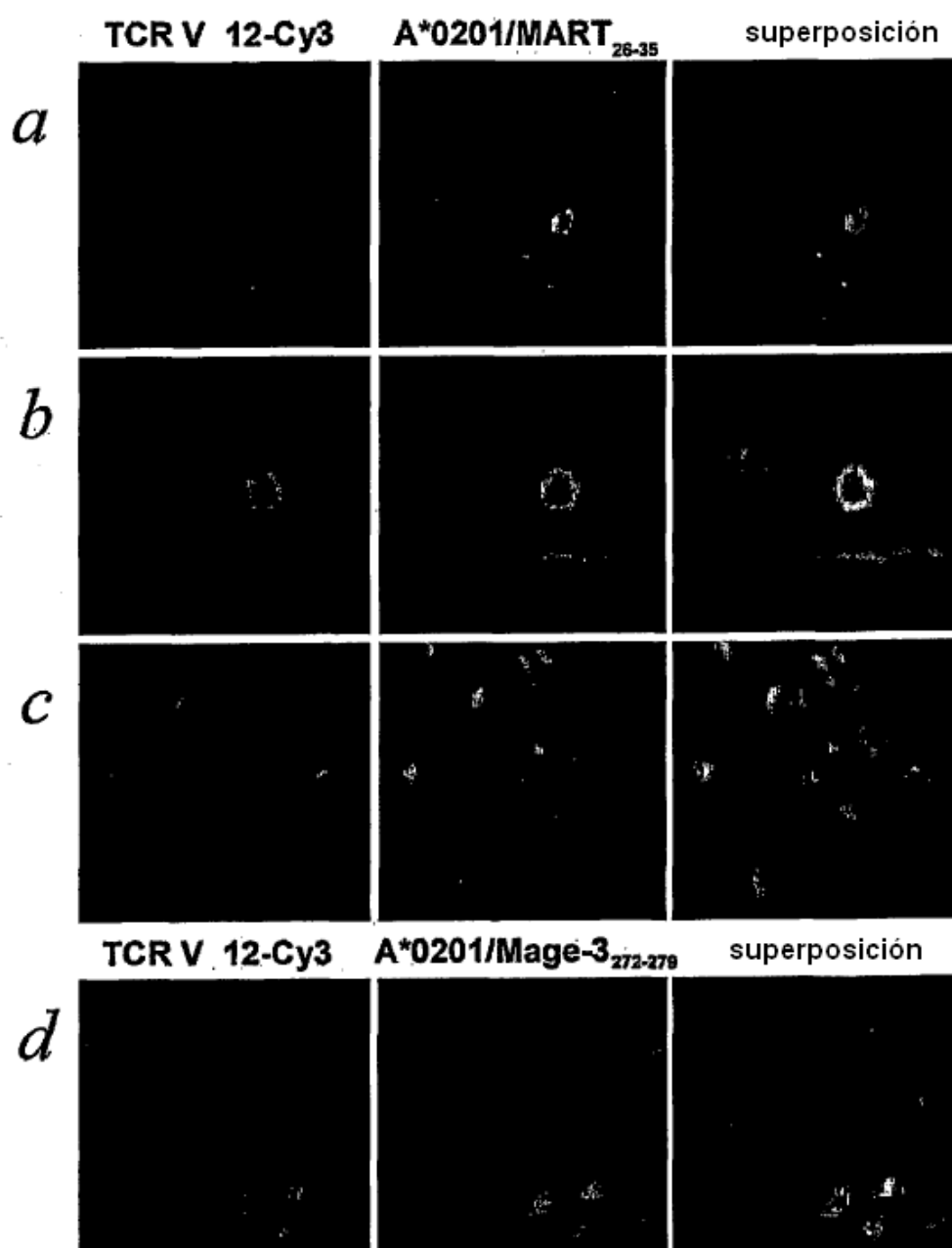


Figura 41

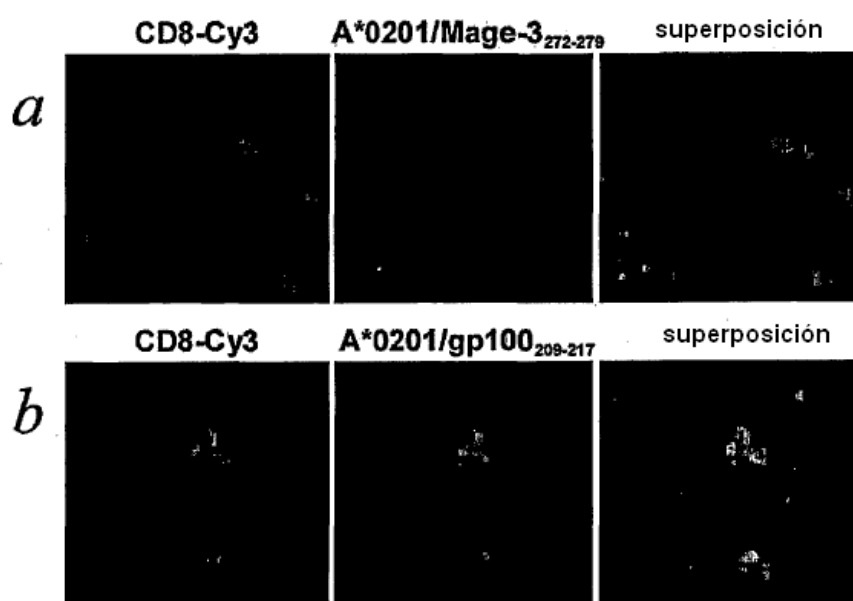


Figura 42

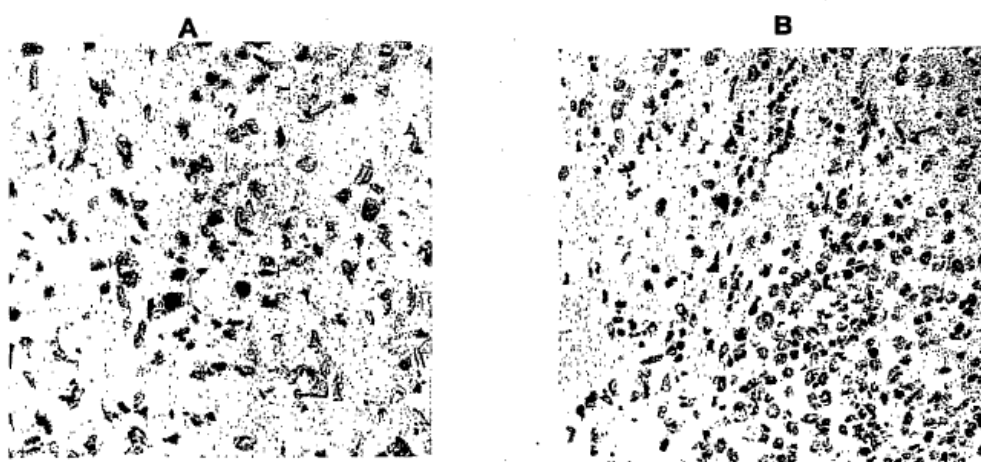


Figura 43

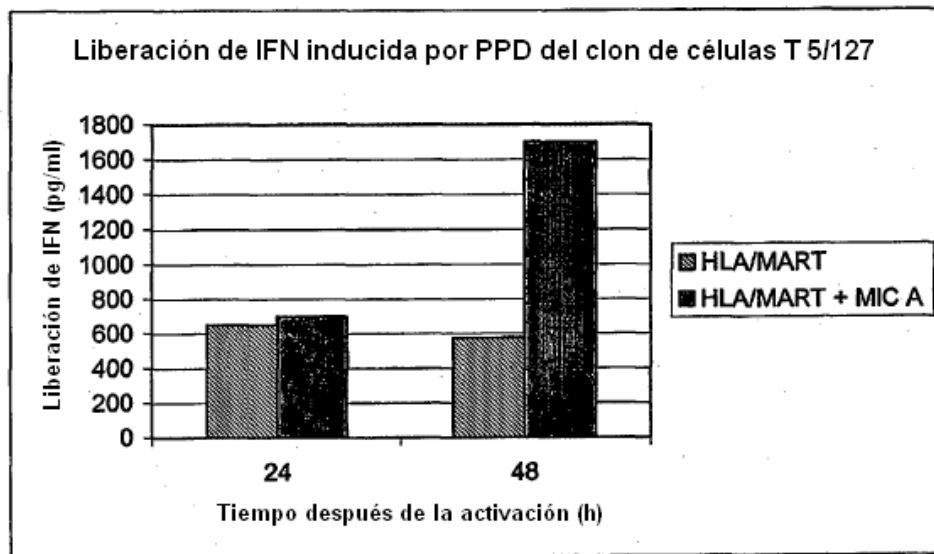


Figura 44

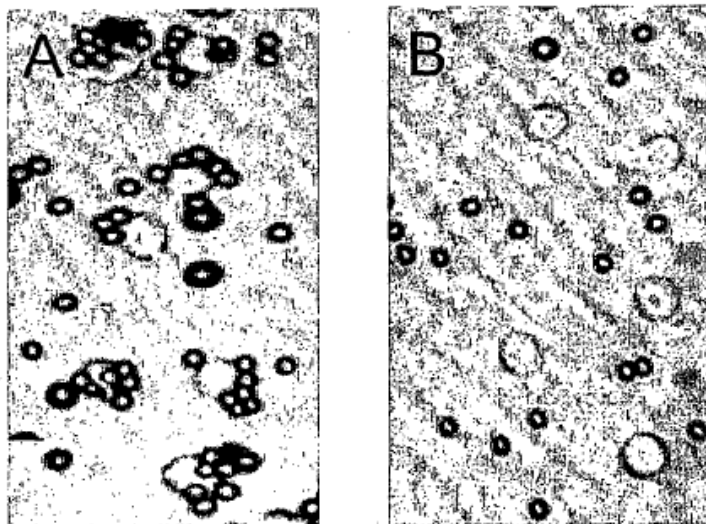


Figura 45

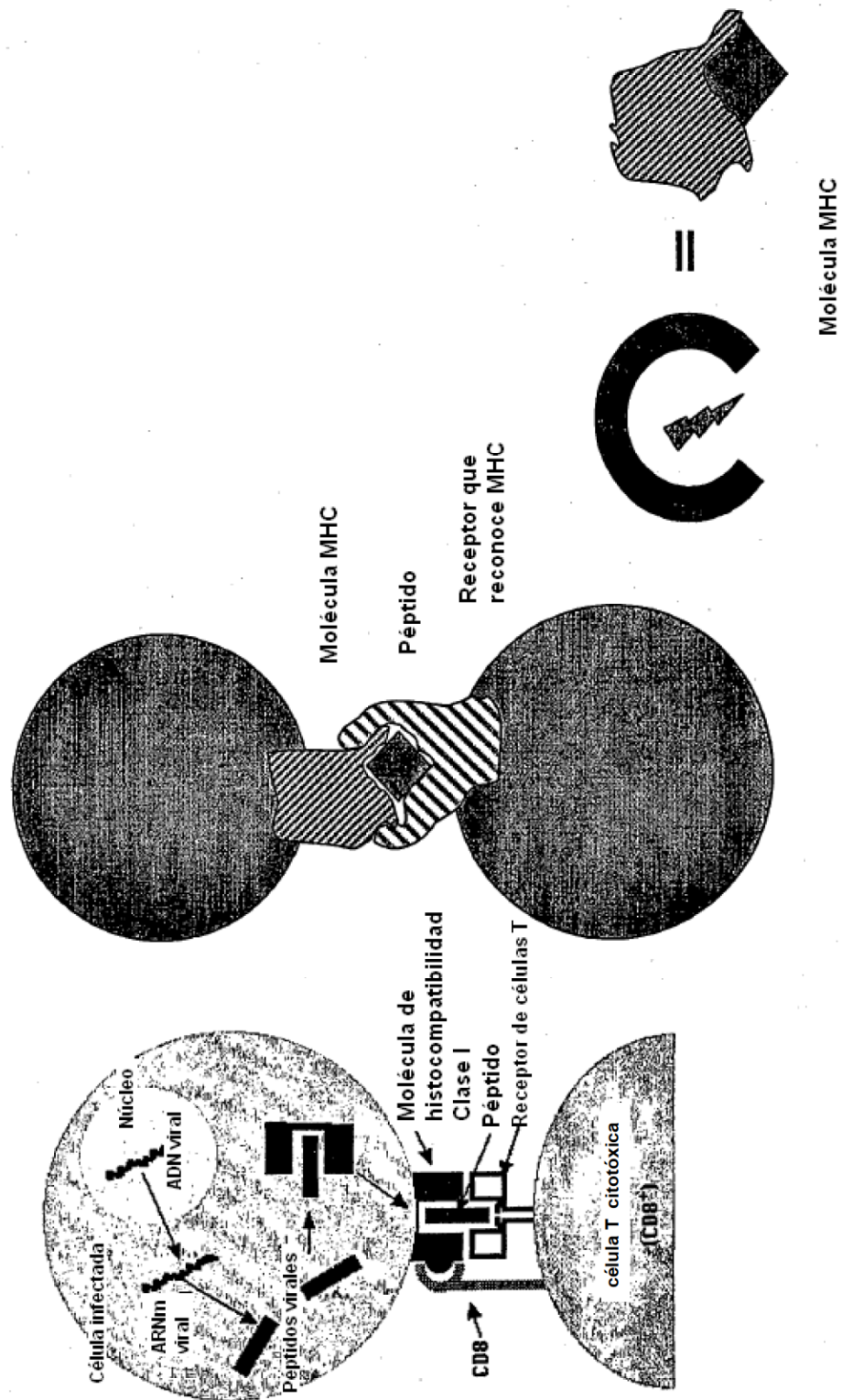


Figura 46

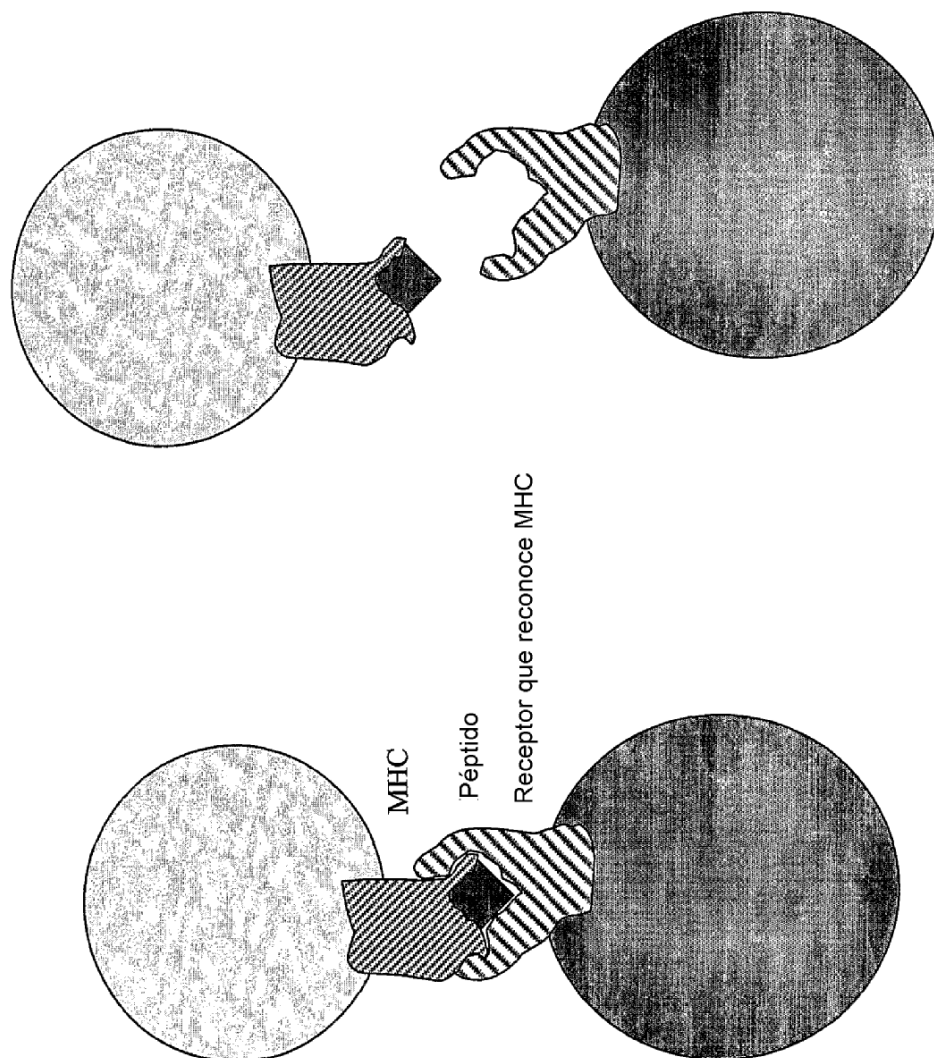


Figura 47

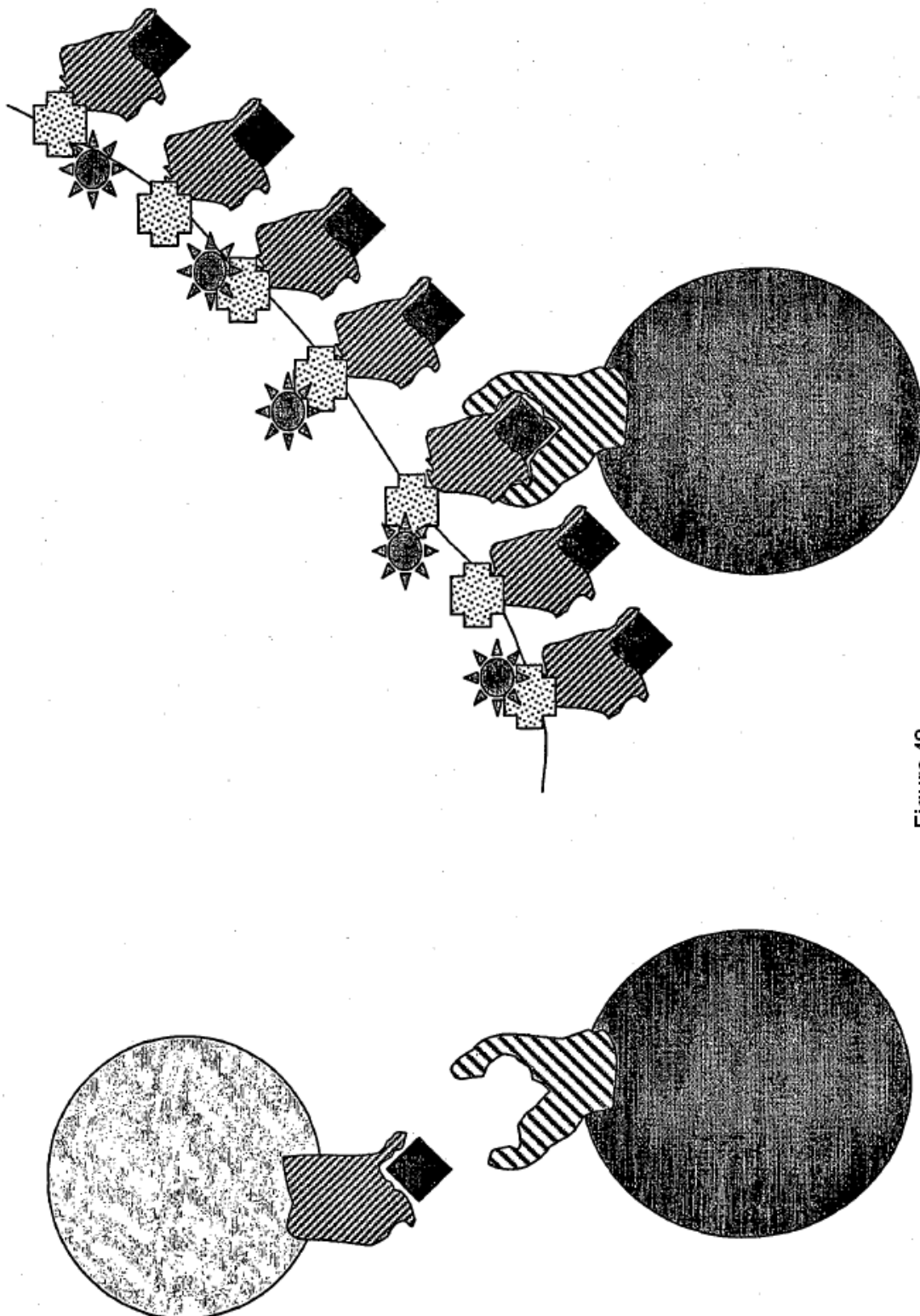


Figura 48

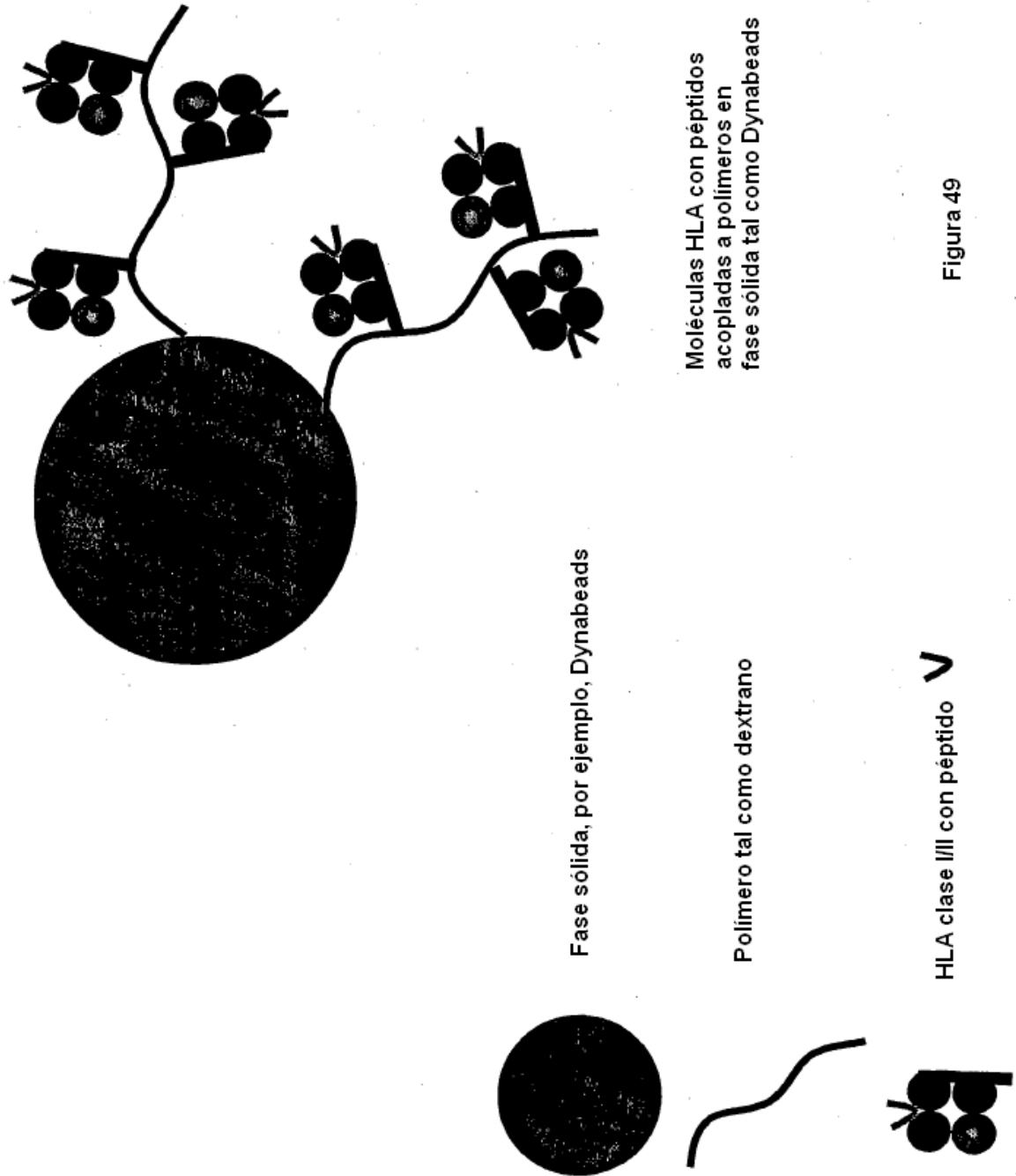


Figura 49

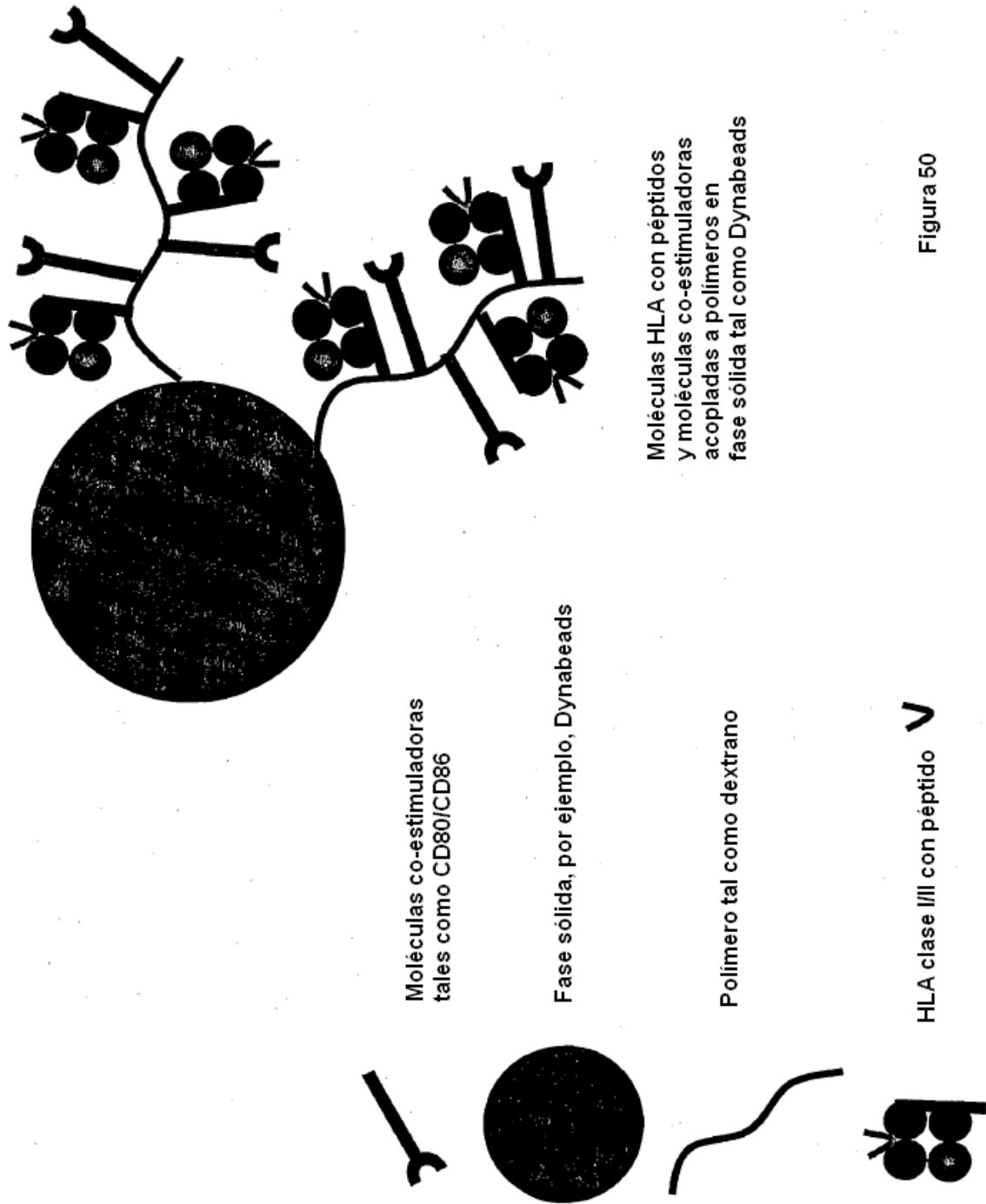
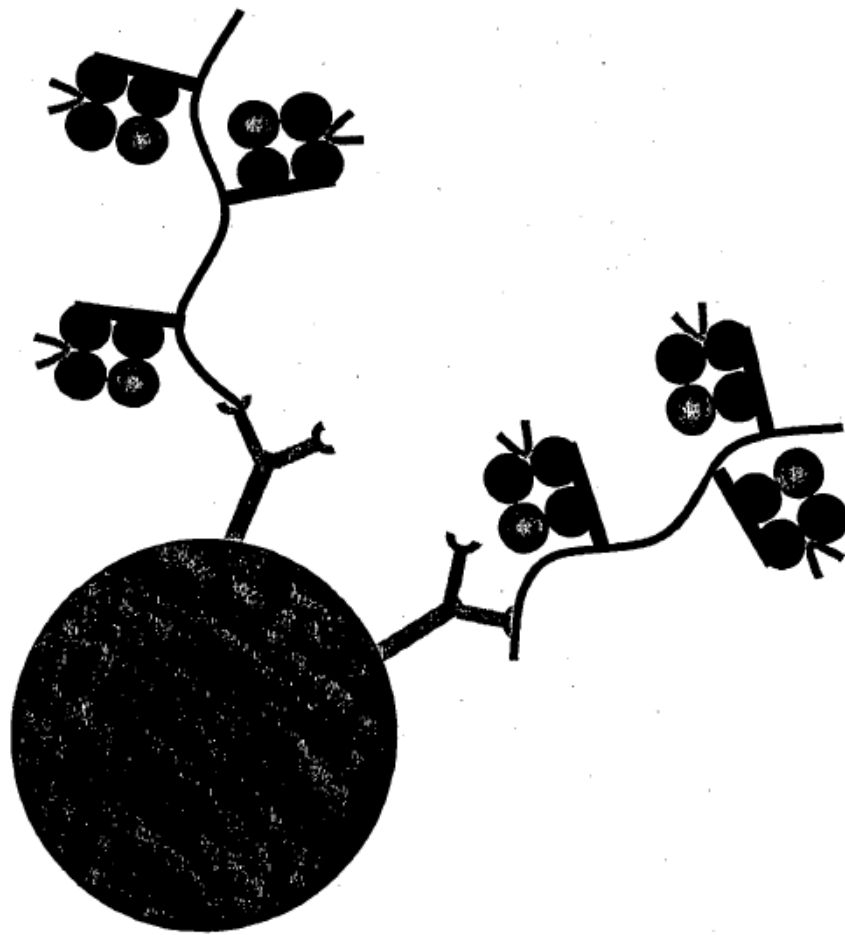


Figura 50



Anticuerpo dirigido
frente al polímero



Fase sólida
por ejemplo Dynabeads



Polímero tal como dextrano



HLA clase III



péptido

Figura 51

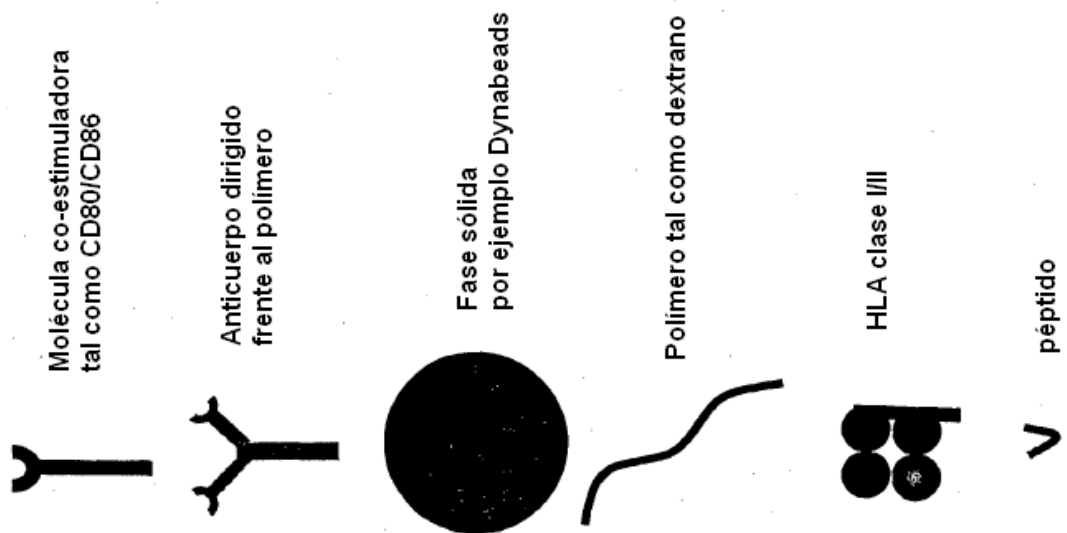


Figura 52

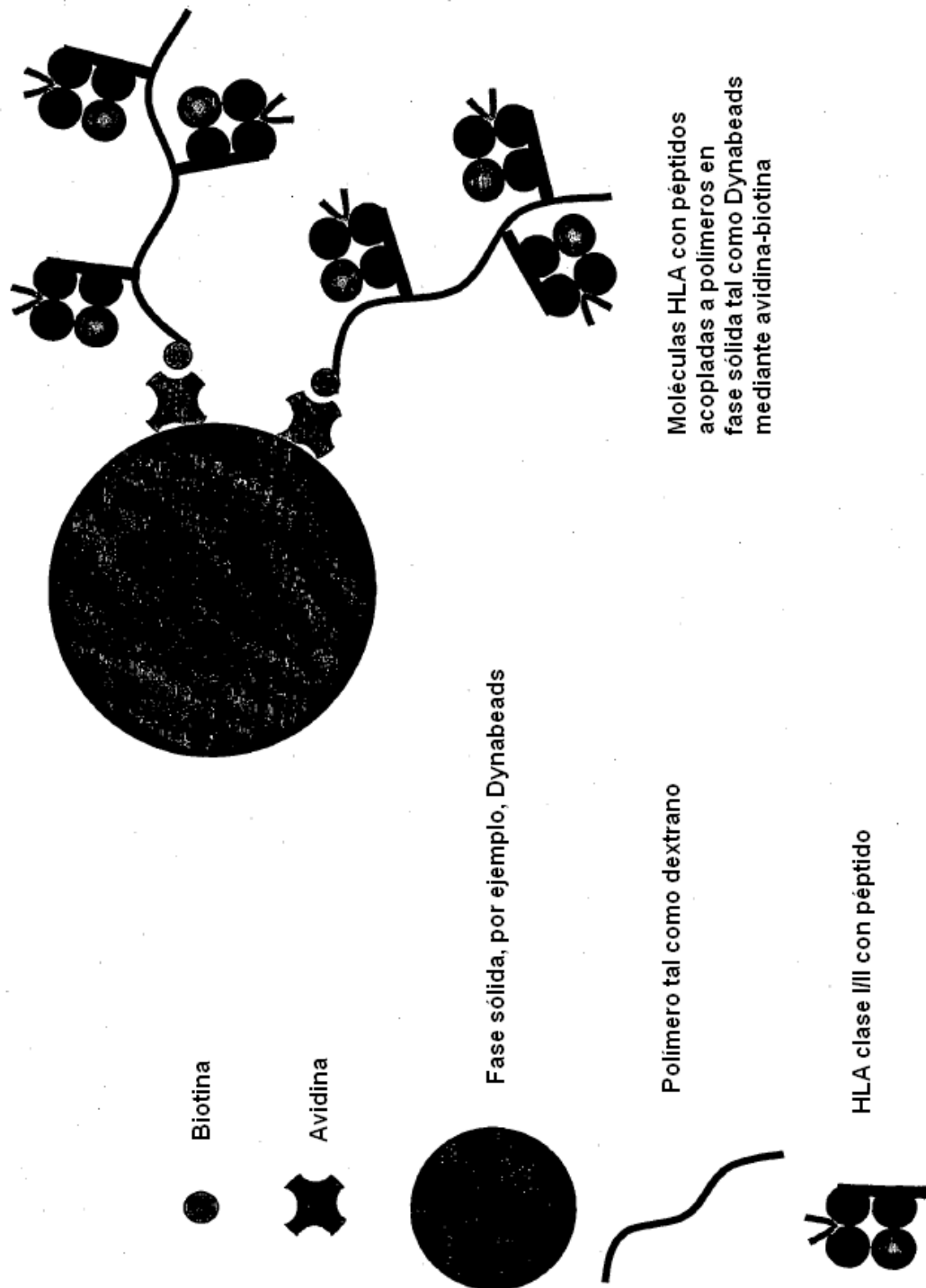


Figura 53



Figura 54

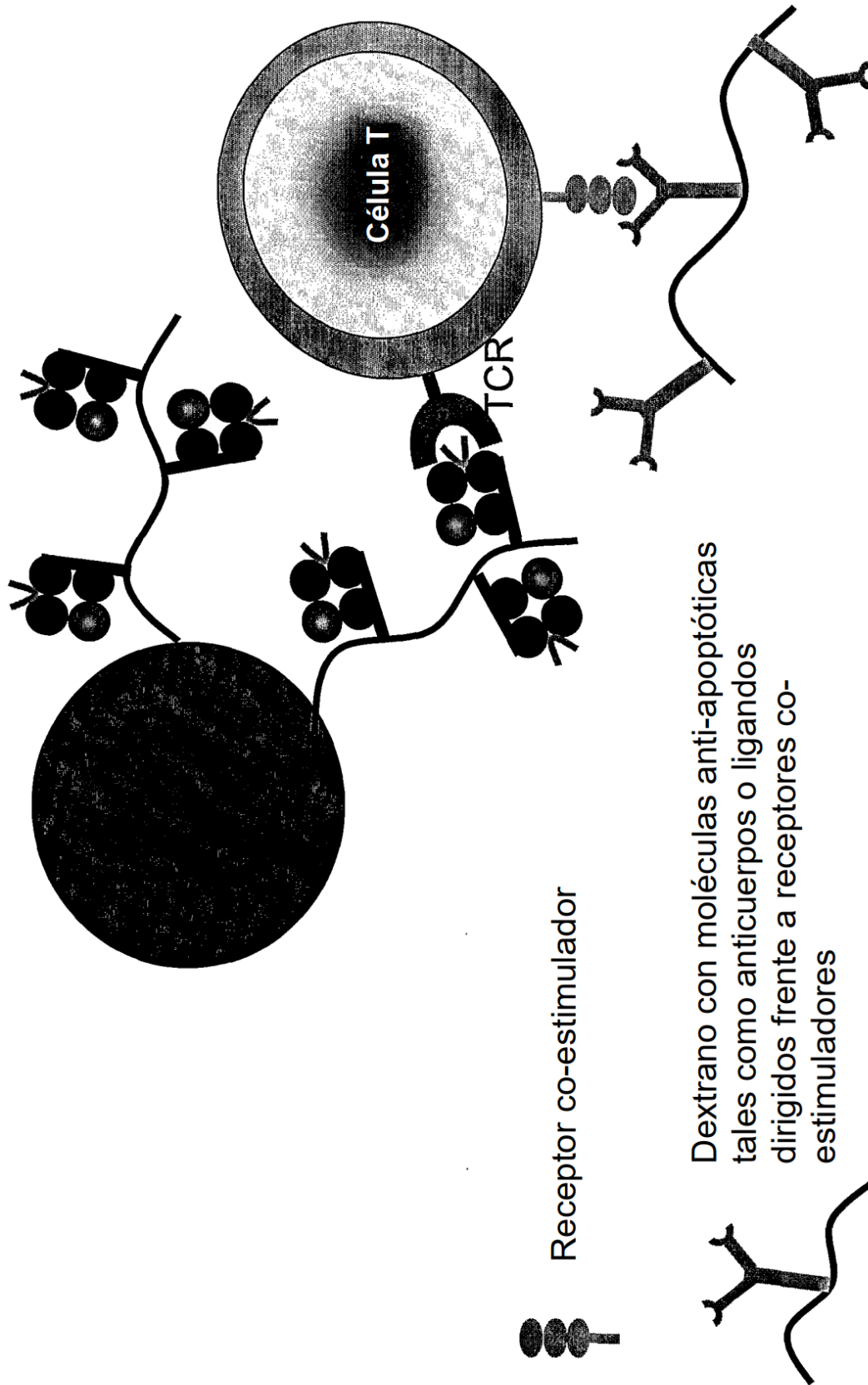
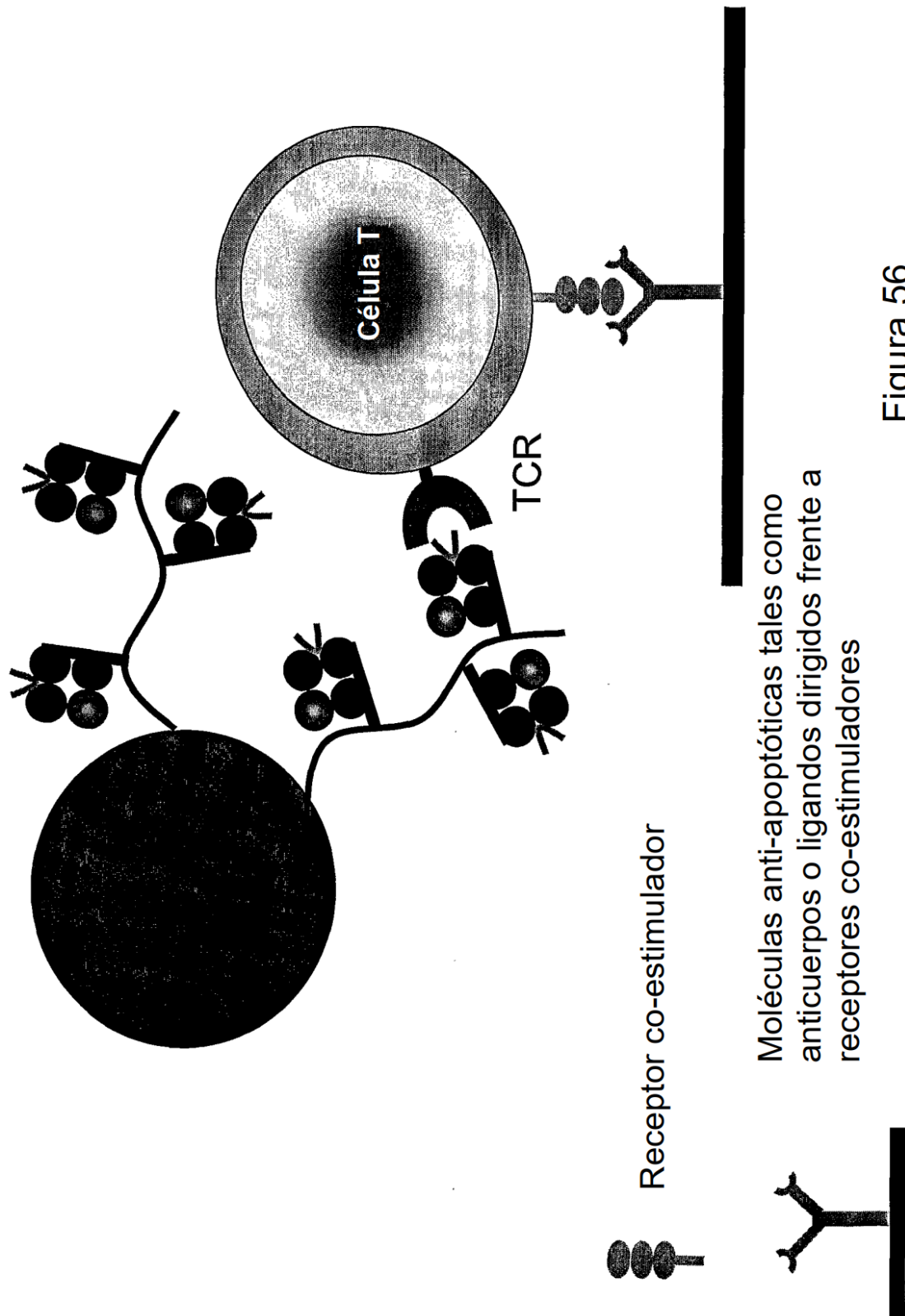


Figura 55



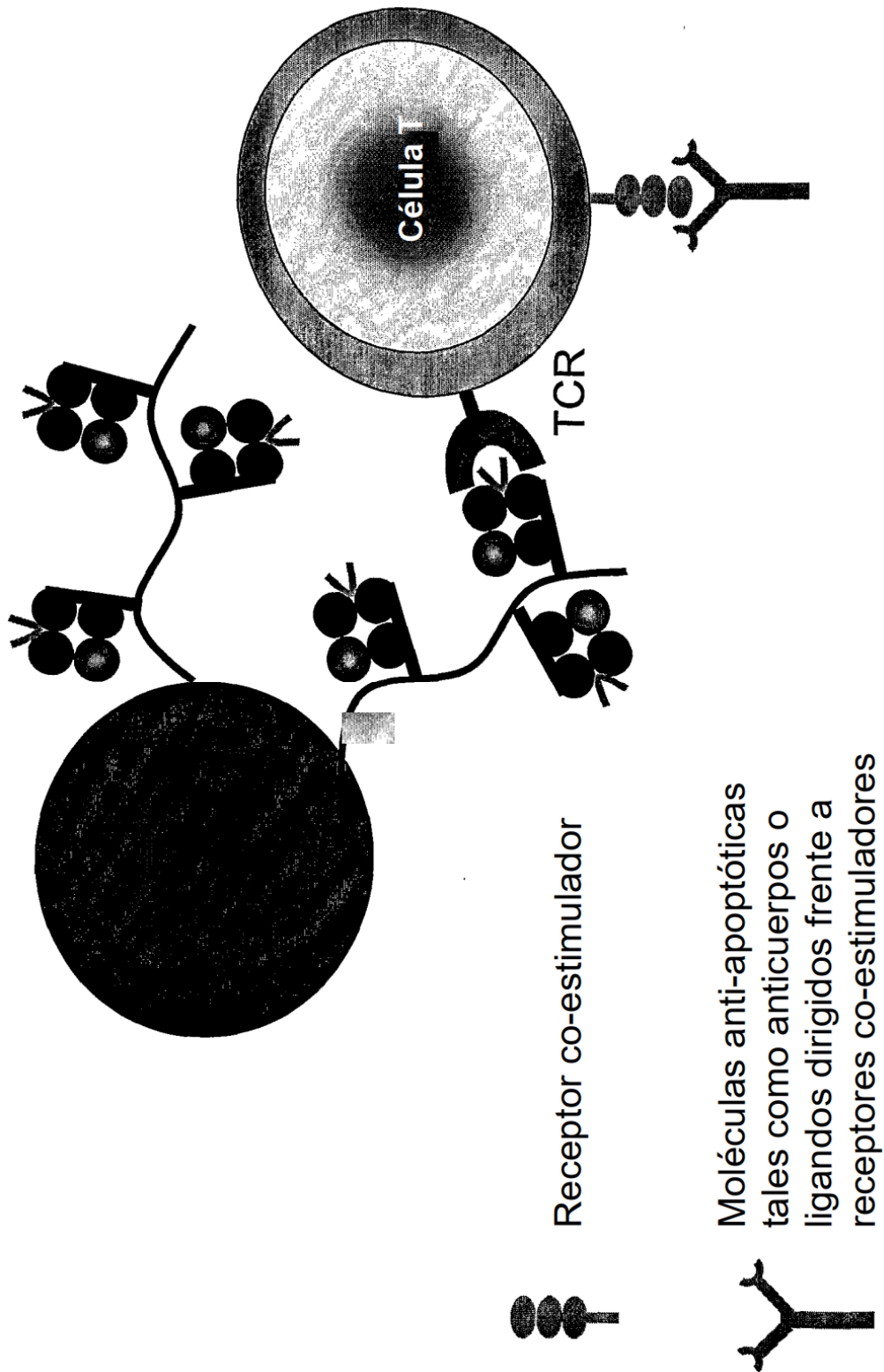


Figura 57