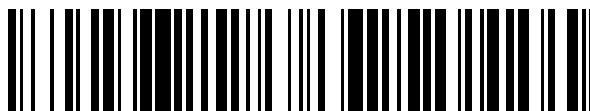


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 634**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/74** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2015 PCT/DK2015/050150**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15185067**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2015 E 15739508 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3152232**

54 Título: **Determinación del reconocimiento de antígenos a través de la codificación de barras de multímeros de MHC**

30 Prioridad:

**06.06.2014 DK 201470340**

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

**02.07.2020**

73 Titular/es:

**HERLEV HOSPITAL (50.0%)**

**Herlev Ringvej 75**

**2730 Herlev, DK y**

**IMMUDEX APS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**REKER HADRUP, SINE;**

**PEDERSEN, HENRIK;**

**JAKOBSEN, SØREN y**

**BENTZEN, AMALIE KAI**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 770 634 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

Determinación del reconocimiento de antígenos a través de la codificación de barras de multímeros de MHC

5 **Campo técnico**

La presente descripción se refiere al reconocimiento de antígenos a través de multímeros de MHC etiquetados con ácido nucleico.

10 **Antecedentes**

El sistema inmunitario adaptativo se dirige a través de interacciones específicas entre las células inmunes y las células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células dendríticas, células B, monocitos y macrófagos) o células diana (por ejemplo, células infectadas por virus, células infectadas por bacterias o células cancerosas). En un campo importante en inmunología, se refiere a la comprensión de la interacción molecular entre una célula inmune y la célula diana.

Específicamente para los linfocitos T (células T), esta interacción está mediada por la unión entre el receptor de células T (TCR) y el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I o clase II. Las moléculas de MHC llevan una carga peptídica, y este péptido es decisivo para el reconocimiento de las células T. La comprensión del reconocimiento de células T experimentó un avance tecnológico dramático cuando Atman y col. (1) en 1996 descubrieron que la multimerización de moléculas de MHC de péptido único en tetrámeros permitiría una fuerza de unión (avidéz) suficiente entre las moléculas de péptido-MHC y el TCR para determinar esta interacción a través de una etiqueta de fluorescencia unida al multímero de MHC. Dichos multímeros de MHC etiquetados con fluorescencia (tanto de las moléculas de clase I como de clase II) ahora se usan ampliamente para determinar la especificidad de las células T. La fluorescencia asociada al multímero de MHC puede determinarse, por ejemplo, mediante citometría de flujo o microscopía, o las células T pueden seleccionarse en base a esta etiqueta de fluorescencia mediante, por ejemplo, citometría de flujo o clasificación basada en perlas. Sin embargo, una limitación a este enfoque se relaciona con el número de diferentes etiquetas de fluorescencia disponibles, ya que cada etiqueta de fluorescencia sirve como una firma específica para el péptido-MHC en cuestión.

Por consiguiente, esta estrategia no coincide con la enorme diversidad en el reconocimiento de células T. Para el subconjunto más predominante de células T (las células T TCR  $\alpha\beta$ ), el número de posibles TCR  $\alpha\beta$  distintos se ha estimado en  $\sim 10^{15}$  (2), aunque el número de TCR distintos en un humano individual es probablemente más cercano a  $10^7$  (3). Por lo tanto, se ha intentado expandir la complejidad de la determinación de células T con el objetivo de permitir la detección de múltiples especificidades de células T diferentes en una sola muestra. Una invención más reciente se refiere a la detección múltiple de células T específicas de antígeno es el uso de multímeros de MHC codificados de manera combinatoria. Esta técnica usaba un enfoque de etiquetado combinatorio de fluorescencia que permitía la detección de 28 poblaciones diferentes de células T en una sola muestra cuando se publicó por primera vez (4,5), pero luego se extendió mediante la combinación con instrumentación novedosa y etiquetas de metales pesados para permitir la detección de alrededor de 100 poblaciones diferentes de células T en una sola muestra (6).

El requisito de nuevas tecnologías que permitan un análisis más completo de las respuestas de células T específicas de antígeno se destaca por el hecho de que varios grupos han intentado desarrollar los llamados microarrays de MHC. En estos sistemas, la especificidad de las células T no está codificada por fluorocromos, sino que está codificada espacialmente (7,8). A pesar de su promesa, los microarrays de MHC no se han adoptado ampliamente, y no hay ejemplos documentados de su valor en la medición multiplexada de respuestas de células T, por ejemplo, la identificación de epítomos.

El documento WO 2009/126828 describe la clasificación múltiple de células y el análisis posterior de dichas células clasificadas, incluida la detección de células T.

El documento de los EE.UU. 2005/019843 describe conjuntos para la detección y la caracterización de respuestas inmunes.

Los documentos WO 2012/094492 y WO 2009/077173 describen procedimientos para identificar compuestos individuales usando un código de barras de ADN.

Los documentos WO 2013/137737 y Seneci y col., 2001 ("Encoding techniques for pool libraries of small organic molecules", Journal of Receptor and Signal Transduction Research, volumen 21, No. 4, páginas 409 a 445) describen el uso de la amplificación por PCR para identificar moléculas marcadas por un código de barras flanqueado por cebadores conservados.

Tomando en cuenta lo anterior, sigue existiendo la necesidad de un procedimiento de alto rendimiento en la técnica de detección, aislamiento y/o identificación de células sensibles a antígenos específicos, tales como las células T específicas de antígeno.

- 5 Además, sigue habiendo una necesidad en la técnica, considerando las cantidades a menudo limitadas de muestra disponibles, para procedimientos que permitan la detección, aislamiento y/o identificación de múltiples especies de células sensibles a antígenos específicos, tales como las células T, en una sola muestra.

**Resumen**

10

La presente descripción se refiere al uso de códigos de barras de ácido nucleico para la determinación y el seguimiento de la especificidad de antígeno de las células inmunes.

- 15 En un aspecto de la presente descripción, un código de barras de ácido nucleico servirá como una etiqueta específica para una molécula péptido-MHC dada que se multimeriza para formar un multímero de MHC. El multímero puede estar compuesto por MHC clase I, clase II, CD1 u otras moléculas similares a MHC. Por consiguiente, cuando el término multímeros de MHC se usa a continuación, esto incluye todas las moléculas similares a MHC. El multímero de MHC se forma a través de la multimerización de moléculas de péptido-MHC a través de diferentes cadenas principales. El código de barras se adjuntará al multímero y servirá como una etiqueta específica para un complejo  
 20 péptido-MHC particular. De esta manera, es posible mezclar hasta 1.000 a 10.000 (o incluso más) diferentes multímeros de péptido-MHC, permitir la interacción específica con células T de sangre u otras muestras biológicas, eliminar los multímeros de MHC no unidos y determinar la secuencia de los códigos de barras de ADN. Al seleccionar una población celular de interés, la secuencia de códigos de barras presentes por encima del nivel de fondo proporcionará una huella digital para la identificación de las células sensibles a antígenos presentes en la población  
 25 celular dada. El número de lecturas de secuencia para cada código de barras específico se correlacionará con la frecuencia de células T específicas, y la frecuencia se puede estimar comparando la frecuencia de lecturas con la frecuencia de entrada de las células T. Esta estrategia puede ampliar nuestra comprensión del reconocimiento de células T.

- 30 El código de barras de ADN sirve como una etiqueta específica para las células T específicas de antígeno y puede usarse para determinar la especificidad de una célula T después de, por ejemplo, clasificación de células individuales, análisis funcionales o evaluaciones fenotípicas. De esta manera, la especificidad del antígeno se puede unir tanto a la secuencia del receptor de células T (que puede revelarse mediante procedimientos de secuenciación de células individuales) como a las características funcionales y fenotípicas de las células específicas de antígeno.

35

Además, esta estrategia puede permitir la unión de varios multímeros de péptido-MHC diferentes (relacionados con la secuencia) a una célula T dada, con la avidéz de unión del multímero de péptido-MHC dado que determina la contribución relativa de cada multímero de péptido-MHC a la unión de TCR de superficie celular. Al aplicar esta característica, es posible permitir la determinación de la secuencia de reconocimiento de especificidad fina/consenso  
 40 de un TCR dado mediante el uso de bibliotecas de péptidos superpuestos o bibliotecas de péptidos de sustitución de alanina. Dicha determinación no es posible con las tecnologías actuales basadas en multímeros de MHC.

Por consiguiente, un aspecto de la descripción se refiere a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) multimérico que comprende

45

- dos o más MHC unidos por una molécula principal; y
- al menos una molécula de ácido nucleico unida a dicha cadena principal, en donde dicha molécula de ácido nucleico comprende un tramo central de ácidos nucleicos (región de código de barras) diseñado para ser amplificado, por ejemplo, por PCR.

- 50 Otro aspecto de la presente descripción se refiere a una composición que comprende un subconjunto de complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) multiméricos según la descripción, en el que cada conjunto de MHC presenta un péptido diferente decisivo para el reconocimiento de células T y una región única de "código de barras" en la molécula de ADN.

- 55 Otro aspecto más de la presente descripción es proporcionar un kit de partes que comprende

- una composición según la descripción; y
- uno o más conjuntos de cebadores para amplificar las moléculas de ácido nucleico.

Otro aspecto más de la presente descripción es proporcionar un procedimiento para detectar células sensibles a  
 60 antígenos en una muestra que comprende:

- proporcionar uno o más complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) multiméricos según la descripción o una composición según la descripción;

- poner dichos MHC multiméricos en contacto con dicha muestra; y
- detectar la unión de los MHC multiméricos a dichas células sensibles a antígenos, detectando así las células sensibles a un antígeno presente en un conjunto de MHC, en el que dicha unión se detecta amplificando la región del código de barras de dicha molécula de ácido nucleico unida a uno o más MHC.

Los aspectos adicionales se refieren a diferentes usos.

### Breve descripción de las figuras

- 10 La figura 1 describe la generación de multímeros de MHC etiquetados con código de barras.
- La figura 2 describe la generación de una biblioteca de multímeros de MHC etiquetados con código de barras.
- 15 La figura 3 describe la detección de células sensibles a antígenos en una sola muestra.
- La figura 4 describe la posibilidad de enlazar la especificidad del antígeno (rastreado por el código de barras) a otras propiedades.
- 20 La figura 5 muestra, en un conjunto de datos experimentales, que la descripción es experimentalmente viable.
- La figura 6 en adelante muestra datos experimentales de los ejemplos 2 en adelante.
- Ahora, la presente descripción se describirá con más detalles a continuación.

### Descripción detallada

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier realización que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención.

### Definiciones

Antes de analizar la presente descripción con más detalles, primero se definirán los siguientes términos y convenciones:

- 35 TCR: Receptor de linfocitos T  
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad  
MHC multimérico: Complejo mayor de histocompatibilidad multimérico

### 40 Código de barras de ácido nucleico

En el presente contexto, un código de barras de ácido nucleico es una secuencia única de oligonucleótidos que varía de 10 a más de 50 nucleótidos. El código de barras presenta secuencias de amplificación compartidas en los extremos 3' y 5', y una secuencia única en el medio. Esta secuencia se puede revelar por secuenciación y puede servir como un código de barras específico para una molécula dada.

### Secuenciación

En el presente aspecto, se entiende que la secuenciación también se relaciona, por ejemplo, con la secuenciación profunda o la secuenciación de la próxima generación, en la que los códigos de barras amplificados (el producto de PCR) se secuencian una gran cantidad de tiempo repetitivo (cantidad de lecturas totales, por ejemplo, cientos de miles de lecturas). El número de lecturas para la secuencia de código de barras individual se relacionará con su presencia cuantitativa en el producto de amplificación, que nuevamente representa su presencia cuantitativa antes de la amplificación, ya que todos los códigos de barras de ADN tienen propiedades de amplificación similares. Por consiguiente, el número de lecturas para una secuencia de código de barras específica en comparación con el número total de lecturas se correlacionará con la presencia de células sensibles a antígenos en la muestra de prueba.

Con referencia ahora a la descripción más detallada, la figura 1 describe el modo en que las moléculas de péptido-MHC, los códigos de barras de ácido nucleico (ADN) y las etiquetas fluorescentes (opcionales) se ensamblan para formar una biblioteca de multímeros de MHC que contiene cada uno un código de barras de ADN específico para la molécula péptido-MHC dada que está implicada. figura 1A) el código de barras está diseñado para presentar secuencias únicas que pueden determinarse mediante secuenciación de ADN. Además, el código de barras presenta

extremos de amplificación compartidos, lo que permite la amplificación de todos los códigos de barras de ADN simultáneamente en una reacción de PCR. Los códigos de barras de ADN están unidos a la cadena principal de multimerización de MHC (por ejemplo, a través de un conector de biotina que se une a estreptavidina en la cadena principal de multímero). La figura 1B representa la cadena principal multimérica. Esto puede ser cualquier cadena principal que permita la multimerización de macromoléculas. La cadena principal puede (opcionalmente) contener una etiqueta de fluorescencia (ilustrada por el asterisco) para rastrear el conjunto total de células que se unen al multímero de MHC independientemente de la especificidad del multímero de péptido-MHC. La figura 1C representa la molécula péptido-MHC de interés, que transporta una carga peptídica específica (línea horizontal). La figura 1D representa los multímeros de péptido-MHC ensamblados que llevan el código de barras de ADN.

10

### **Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) multimérico**

Un aspecto de la descripción se refiere a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) multimérico que comprende - dos o más MHC unidos por una molécula principal; y

15 - al menos una molécula de ácido nucleico unida a dicha cadena principal, en donde dicha molécula de ácido nucleico comprende un tramo central de ácidos nucleicos (región de código de barras) diseñado para ser amplificado, por ejemplo, por PCR.

Se pueden usar diferentes tipos de cadena principal. Por consiguiente, en una realización de la descripción, la molécula de la cadena principal se selecciona de entre el grupo que consiste en polisacáridos, tales como glucanos, dextrano, estreptavidina o un multímero de estreptavidina. El experto en la materia puede encontrar otras cadenas principales alternativas.

Los MHC se pueden acoplar a la cadena principal por diferentes medios. Por consiguiente, en una realización de la descripción, los MHC están acoplados a la cadena principal a través de una unión de estreptavidina-biotina o una unión de estreptavidina-avidina. De nuevo, se pueden usar otras fracciones de unión. El enlace específico puede usar puntos de acoplamiento específicos. En otra realización de la descripción, los MHC están unidos a la cadena principal a través de la cadena pesada de MHC.

El MHC consta de diferentes elementos, que pueden expresarse y purificarse en parte de los sistemas celulares (como la cadena pesada del MHC y el elemento Beta-2-microglobulina). Alternativamente, los elementos pueden sintetizarse químicamente. El péptido específico preferentemente se sintetiza de manera química.

Los tres elementos son necesarios para la generación de un MHC (complejo) estable. Por consiguiente, en una realización de la descripción, el MHC se ensambla artificialmente.

El MHC multimérico puede comprender diferentes números de MHC. Por consiguiente, en incluso otra realización de la descripción, el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) multimérico está compuesto de al menos cuatro MHC, como al menos ocho, diez, de 2 a 30, de 2 a 20, de 2 a 10 o tal como de 4 a 10 MHC.

40

El componente de ácido nucleico (preferentemente ADN) presenta una estructura especial. Por consiguiente, en una realización de la descripción, la al menos una molécula de ácido nucleico está compuesta de al menos una primera región de cebador 5', una región central (región de código de barras) y una segunda región de cebador 3'. De esta manera, la región central (la región del código de barras) puede amplificarse mediante un conjunto de cebadores. La longitud de la molécula de ácido nucleico también puede variar. Por consiguiente, en otra realización de la descripción, la al menos una molécula de ácido nucleico presenta una longitud en el intervalo de 20 a 100 nucleótidos, tal como de 30 a 100, de 30 a 80 o de 30 a 50 nucleótidos. El acoplamiento de la molécula de ácido nucleico a la cadena principal también puede variar. Por consiguiente, en una realización adicional de la descripción, la al menos una molécula de ácido nucleico se une a dicha cadena principal a través de una unión de estreptavidina-biotina y/o una unión de estreptavidina-avidina. También se pueden usar otras fracciones de acoplamiento.

50

En una realización adicional de la descripción, la al menos una molécula de ácido nucleico comprende o consiste en ADN, ARN y/o nucleótidos artificiales, tales como PLA o LNA. Preferentemente ADN, pero se pueden incluir otros nucleótidos para, por ejemplo, aumentar la estabilidad.

55

Diferentes tipos de MHC pueden formar parte del multímero. Por consiguiente, en una realización de la descripción, el MHC se selecciona de entre el grupo que consiste en MHC de clase I, un MHC de clase II, un CD1 o una molécula similar a MHC. Para el MHC de clase I, el péptido presentador es un péptido de 9 a 11 meros; para el MHC de clase II, el péptido presentador es un péptido de 12 a 18 meros. Para las moléculas de MHC alternativas, pueden presentarse fragmentos de lípidos o glucopolímeros.

60

También podría ser ventajoso si fuera posible determinar el conjunto completo de multímeros unidos cuando se

incuban con una muestra (de células). Por consiguiente, en una realización preferida de la descripción, la cadena principal comprende además uno o más etiquetas fluorescentes unidas. Al presentar dicho acoplamiento, se puede hacer una mejor cuantificación. De manera similar, el etiquetado se puede usar para la clasificación celular.

## 5 Composición

La figura 2 ilustra la generación de una biblioteca completa de códigos de barras. figura 2A, esta biblioteca está compuesta de múltiples, potencialmente más de 1.000, multímeros de péptido-MHC diferentes, cada uno con un código de barras de ADN específico. De modo tal que el código de barras #1 codifica el complejo péptido-MHC #1, el código de barras #2 codifica el complejo péptido-MHC #2, el código de barras #3 codifica el complejo péptido-MHC #3 y así sucesivamente hasta la posible mezcla de miles de especificidades diferentes con un código de barras específico. La figura 2B representa el reactivo final, que es una mezcla de numerosos multímeros de MHC diferentes, cada uno de los cuales lleva un código de barras de ADN específico como etiqueta para cada especificidad de péptido-MHC.

Como se describió anteriormente, se puede usar un grupo (biblioteca) de diferentes conjuntos de complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) multiméricos para analizar una población celular global, a fin de determinar su especificidad para los péptidos. Por consiguiente, otro aspecto de la descripción se refiere a una composición que comprende un subconjunto de complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) multiméricos según la descripción, en el que cada conjunto de MHC presenta un péptido diferente, decisivo para el reconocimiento de células T, y una región única de "código de barras" en la molécula de ADN. En el presente contexto, debe entenderse que cada complejo mayor de histocompatibilidad multimérico específico está presente en la composición con un cierto número y que hay un subconjunto de diferentes complejos mayores de histocompatibilidad multiméricos presente en la composición.

Preferentemente, toda la región específica para cada MHC multimérico se puede determinar con solo unos pocos conjuntos de cebadores, preferentemente solo un conjunto de cebadores. Por consiguiente, en una realización de la descripción, las regiones cebadoras en la molécula de ADN son idénticas para cada conjunto de MHC. De esta manera, solo se requiere un conjunto de cebadores. En una realización alternativa de la descripción, los MHC multiméricos están agrupados por diferentes conjuntos de cebadores, permitiendo así la multiplicación de diferentes conjuntos de MHC multiméricos. De esta manera, es posible limitar el ruido de fondo, al tiempo que se recupera información de enlaces específicos. Por consiguiente, se pueden usar diferentes conjuntos de cebadores para diferentes conjuntos de MHC.

El número de conjuntos individuales de MHC multiméricos puede variar. Por consiguiente, en una realización de la descripción, la composición comprende al menos 10 conjuntos diferentes de MHC multiméricos, como al menos 100, 500, 1.000, 5.000, tal como en el intervalo de 10 a 50.000, como de 10 a 1.000 o de 50 a 500 conjuntos de MHC.

### Kit de partes

La composición de la descripción puede formar parte de un kit. Por consiguiente, aun otro aspecto de la descripción hace referencia a un kit de piezas que comprende

- una composición según la descripción; y
- uno o más conjuntos de cebadores para amplificar las moléculas de ADN.

### Procedimiento para detectar células sensibles a antígenos en una muestra

En la figura 3 se ilustra cómo se puede usar esta biblioteca para la tinción de células sensibles a antígenos en una sola muestra. figura 3A, las células en suspensión de células individuales (por ejemplo, aunque no exclusivamente, se originan a partir de sangre periférica, biopsias de tejidos u otros fluidos corporales) se mezclan con la biblioteca de péptidos representada en la figura 2B. figura 3B, después de la tinción, las células se lavan secuencialmente y se centrifugan para eliminar los multímeros de MHC residuales que no están unidos a una superficie celular. Las poblaciones de células específicas, por ejemplo, las células T (restringidas en CD8 o CD4), otras células inmunes o específicamente las células T de unión a multímeros de MHC pueden clasificarse por citometría de flujo u otros medios de clasificación/selección de células. figura 3C, las secuencias de oligonucleótidos de código de barras de ADN aisladas de la población celular se amplifican por PCR. figura 2D, este producto de amplificación se secuenciará por secuenciación profunda (proporcionando de diez a cientos de miles de lecturas). La secuencia revelará la secuencia de código de barras específica de los códigos de barras de ADN unidos a las células en la muestra después de la selección, ya que estos aparecerán con más frecuencia que las secuencias asociadas al fondo de la unión no específica de multímeros de MHC. La relación "señal/ruido" se contrarresta por el hecho de que cualquier evento de multímero de MHC inespecífico tendrá una asociación aleatoria de 1/1.000 códigos de barras diferentes (dependiendo del tamaño de la biblioteca), haciéndolo aún más sensible que la tinción normal de multímeros.

Mediante análisis de datos de secuencia de códigos de barras, se puede determinar la especificidad de antígeno de las células en la muestra. Cuando se detecta el código de barras de ADN #1 por encima del nivel de fondo de las lecturas, significa que el multímero de péptido-MHC #1 se unió preferentemente al tipo de célula seleccionado. Lo mismo ocurre con el código de barras No. 2, 3, 4, 5, etc. hasta la combinación potencial de más de 1.000 (pero sin restricción a este número particular). Cuando se conoce el número de células de entrada, por ejemplo, cuando las poblaciones celulares de interés se capturan a través de una señal de fluorescencia también unida al multímero mediante la clasificación basada en citometría de flujo u otros medios de captura/clasificación, la frecuencia específica de células T se puede calcular comparando la frecuencia de las lecturas de códigos de barras para el número de células T clasificadas.

Por lo tanto, los MHC multiméricos y/o las composiciones según la descripción pueden usarse para diferentes propósitos. Por consiguiente, incluso otro aspecto de la descripción se refiere a un procedimiento para detectar células sensibles a antígenos en una muestra que comprende:

- 15 - proporcionar uno o más complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) multiméricos o una composición según la descripción;
- poner dichos MHC multiméricos en contacto con dicha muestra; y
- detectar la unión de los MHC multiméricos a dichas células sensibles a antígenos, detectando así las células sensibles a un antígeno presente en un conjunto de MHC,
- 20 en el que dicha unión se detecta amplificando la región del código de barras de dicha molécula de ácido nucleico unida a uno o más MHC (A través de la cadena principal).

En una realización de la descripción, el procedimiento incluye proporcionar la muestra (biológica).

- 25 Como es de conocimiento para el experto en la materia, las moléculas no unidas preferentemente deberían eliminarse. Por consiguiente, en una realización de la descripción, los MHC no unidos (multiméricos) se eliminan antes de la amplificación, por ejemplo, mediante lavado y/o centrifugado, seguido de la eliminación del sobrenadante.

El tipo de muestra también puede variar. En una realización de la descripción, la muestra es una muestra biológica.

- 30 En una realización de la descripción, la muestra es una muestra de sangre, tal como una muestra de sangre periférica, una muestra derivada de sangre, una biopsia de tejido u otro fluido corporal, tal como líquido cefalorraquídeo o saliva. La fuente de la muestra también puede variar. Por consiguiente, en una realización adicional de la descripción, dicha muestra se ha obtenido de un mamífero, tal como un ser humano, un ratón, cerdos y/o caballos.

- 35 También puede ser ventajoso poder clasificar las células. Por consiguiente, en una realización de la descripción, el procedimiento comprende además la clasificación de células mediante, por ejemplo, citometría de flujo, tal como FACS. Esto puede hacerse, por ejemplo, si la cadena principal está equipada con un marcador fluorescente. Por consiguiente, las células no unidas también pueden eliminarse/clasificarse.

- 40 Como también resulta del conocimiento de un experto en la materia, los valores medidos se comparan preferentemente con un nivel de referencia. Por consiguiente, en una realización de la descripción, dicha detección de unión incluye comparar valores medidos con un nivel de referencia, por ejemplo, un control negativo y/o un nivel total de respuesta en la muestra. En una realización adicional de la descripción, dicha amplificación es PCR, tal como qPCR.

- 45 Como también se mencionó anteriormente, la detección del código de barras incluye la secuenciación de las regiones de código de barras amplificadas. Por consiguiente, en una realización de la descripción, la detección de las regiones del código de barras incluye la secuenciación de dicha región del código de barras, tal como por secuenciación profunda o secuenciación de próxima generación.

50

#### **Uso de un complejo mayor de histocompatibilidad multimérico**

- En la figura 4, se ilustra el modo en que esta tecnología se puede usar para enlazar diferentes propiedades a la especificidad de antígeno de una población celular. La figura 4A. ilustra el modo en que las células, después de unirse a una biblioteca multimérica de MHC etiquetado con código de barras, pueden exponerse a ciertos estímulos. Las poblaciones celulares se pueden seleccionar en función de la respuesta funcional a este estímulo (por ejemplo, aunque no de manera exclusiva, la secreción de citocinas, la fosforilación, la liberación de calcio u otras numerosas medidas). Después de seleccionar la población sensible o no sensible (siguiendo las etapas de la figura 2), los códigos de barras de ADN se pueden secuenciar para decodificar la capacidad de respuesta del antígeno y, así, determinar las especificidades del antígeno involucradas en una respuesta dada.

La figura 4B ilustra cómo se pueden seleccionar las células en función del fenotipo, para enlazar un cierto conjunto de

características fenotípicas a la respuesta a antígenos.

La figura 4C representa la posibilidad de clasificación de células individuales de células de unión a un multímero de MHC en base a la etiqueta de fluorescencia unida en el multímero de MHC. Mediante la clasificación de una sola célula, la especificidad de antígeno de la célula dada se puede determinar a nivel de una sola célula mediante la secuenciación de la etiqueta de código de barras asociada. Esto se puede enlazar al TCR que también se puede secuenciar a nivel de una sola célula, como se describió recientemente (10). Por medio de esta invención, esta descripción proporcionará un enlace entre la secuencia de TCR u otras propiedades unicelulares y la especificidad del antígeno, y puede, mediante el uso de bibliotecas de multímeros de MHC etiquetados con código de barras, permitir la definición de TCR específicos de antígeno en una mezcla de miles de especificidades diferentes.

La figura 4D ilustra el uso de bibliotecas de multímeros de MHC etiquetados con código de barras para la evaluación cuantitativa de la unión de multímeros de MHC a un clon de células T dado o células transducidas/transfectadas con TCR. Dado que la secuenciación de la etiqueta del código de barras permite determinar simultáneamente varias etiquetas diferentes en la misma población celular, esta estrategia se puede usar para determinar la avidéz de un TCR dado en relación con una biblioteca de multímeros de péptido-MHC relacionados. La contribución relativa de las diferentes secuencias de código de barras de ADN en la lectura final se determina en función de la contribución cuantitativa de la unión de TCR para cada uno de los diferentes multímeros péptido-MHC en la biblioteca. Mediante análisis basados en la valoración es posible determinar las propiedades de unión cuantitativa de un TCR en relación con una gran biblioteca de multímeros de péptido-MHC. Todos se fusionaron en una sola muestra. Para este propósito particular, la biblioteca de multímeros de MHC puede contener específicamente secuencias peptídicas relacionadas o bibliotecas de péptidos de sustitución de alanina.

La figura 5 muestra datos experimentales para la viabilidad de unir un código de barras de ADN a un multímero de MHC y amplificar las secuencias específicas después de la tinción de células T. La figura 5A muestra la tinción de células T específicas de citomegalovirus (CMV) en muestras de sangre periférica. Los multímeros específicos de péptido-MHC derivados de CMV se marcaron con un código de barras (código de barras #1) y se mezclaron con un multímero de péptido-MHC irrelevante/no específico etiquetado con código de barras (código de barras #2) y se mezclaron con otros 998 multímeros de MHC específicos etiquetados sin código de barras. Los datos en esta invención muestran la viabilidad para la tinción de células T específicas de CMV en una mezcla de otros 1.000 multímeros de MHC. Los datos se muestran para tres protocolos de tinción diferentes. La figura 5B muestra la lectura de las secuencias de códigos de barras específicas por PCR cuantitativa. El código de barras #1 (B#1) determina la célula T específica de CMV detectada para los tres protocolos de tinción, mientras que la señal de código de barras irrelevante/no específica, código de barras #2 (B#2) es indetectable.

En general, pueden encontrarse diferentes usos para los MHC o composiciones multiméricas que comprenden tales conjuntos. Por consiguiente, un aspecto se refiere al uso de un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) multimérico o una composición según la descripción para la detección de células sensibles a antígenos en una muestra.

Otro aspecto se refiere al uso de un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) multimérico o una composición según la descripción en el diagnóstico de enfermedades o condiciones, preferentemente cáncer y/o enfermedades infecciosas.

Un aspecto adicional se refiere al uso de un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) multimérico o una composición según la descripción en el desarrollo de terapias inmunitarias.

Incluso otro aspecto adicional se refiere al uso de un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) multimérico o una composición según la descripción en el desarrollo de vacunas.

Otro aspecto se refiere al uso de un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) multimérico o una composición según la descripción para la identificación de epítomos.

En resumen, las ventajas de la presente descripción incluyen, entre otras, la posibilidad de detección de múltiples (potencialmente, pero exclusivamente, > 1.000) diferentes células sensibles a antígenos en una sola muestra. La tecnología se puede usar para, pero no se restringe a, la asignación de epítomos de células T, el descubrimiento de reconocimiento inmunitario, pruebas de diagnóstico y la medición de la reactividad inmunológica después de la vacunación o terapias relacionadas con el sistema inmunitario.

Este nivel de complejidad nos permite pasar de los antígenos modelo a la determinación de la reactividad inmune específica del epítomo que cubre organismos completos, genomas virales, genomas de cáncer, todos los componentes de la vacuna, etc. Se puede modificar de forma personalizada dependiendo de la expresión de MHC de los individuos



y puede usarse para seguir enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario, como diabetes, artritis reumatoide o similares.

Los materiales biológicos se analizan, por ejemplo, para controlar las respuestas inmunitarias que se producen de forma natural, como las que pueden ocurrir tras una infección o cáncer. Además, los materiales biológicos se analizan para determinar el efecto de las terapias inmunitarias, incluidas las vacunas, sobre las respuestas inmunitarias. La terapia inmunitaria, como se usa aquí, se define como componentes activos en intervenciones médicas que tienen como objetivo mejorar, suprimir o modificar las respuestas inmunitarias, incluidas las vacunas, los estimulantes inmunes no específicos, los inmunosupresores, las inmunoterapias basadas en células y sus combinaciones.

La descripción se puede usar, entre otras cosas, para el desarrollo de kits de diagnóstico, donde se puede determinar una huella digital de la respuesta inmune asociada a la enfermedad dada en cualquier muestra biológica. Dichos kits de diagnóstico pueden usarse para determinar la exposición a infecciones bacterianas o virales o enfermedades autoinmunes, por ejemplo, aunque no exclusivamente, las relacionadas con la tuberculosis, la gripe y la diabetes. Se puede usar un enfoque similar para las terapias inmunitarias donde la respuesta inmunitaria puede servir como un biomarcador para la respuesta terapéutica. Los análisis con una biblioteca de multímeros de MHC etiquetados con un código de barras permiten una evaluación de alto rendimiento de grandes cantidades de células sensibles al antígeno en una sola muestra.

Además, los multímeros de MHC etiquetados con código de barras pueden usarse en combinación con la clasificación de células individuales y la secuenciación TCR, donde la especificidad del TCR puede determinarse mediante el código de barras coadjunto. Esto nos permitirá identificar la especificidad de TCR para potencialmente más de 1.000 células T sensibles a antígenos diferentes en paralelo desde la misma muestra, y hacer coincidir la secuencia de TCR con la especificidad del antígeno. El potencial futuro de esta tecnología se relaciona con la capacidad de predecir la respuesta a antígenos basada en la secuencia de TCR. Esto sería muy interesante ya que los cambios en el uso de TCR se han asociado a la terapia inmunitaria (11, 12).

Además, existe una creciente necesidad de identificar los TCR responsables del reconocimiento de las células diana (por ejemplo, aunque no de manera exclusiva, en lo que respecta al reconocimiento del cáncer). Los TCR se han usado con éxito en el tratamiento del cáncer (13), y esta línea de iniciativas clínicas se ampliará aún más en el futuro. La complejidad de las bibliotecas multímero de MHC etiquetadas con código de barras permitirá la selección personalizada de TCR relevantes en un individuo determinado.

Debido a la lectura de la secuencia de código de barras, la tecnología de multímero de MHC etiquetado con código de barras permite la interacción de varios complejos péptido-MHC diferentes en una sola superficie celular, manteniendo una lectura útil. Cuando una célula T se une a múltiples complejos diferentes péptido-MHC en la biblioteca, su contribución relativa a la unión de células T puede determinarse por el número de lecturas de las secuencias dadas. En base a esta característica, es posible determinar las secuencias de consenso/especificidad fina de un TCR. Cada TCR puede reconocer un gran número de diferentes complejos péptido-MHC, cada uno con diferente afinidad (14). La importancia de dicha evaluación cuantitativa ha aumentado con el uso clínico de los TCR y la falta de conocimiento puede tener consecuencias fatales como se ejemplificó recientemente en un estudio clínico donde el reconocimiento cruzado de un péptido relacionado con la secuencia resultó en insuficiencia cardíaca fatal en dos casos (15, 16). Por consiguiente, esta característica particular para la evaluación cuantitativa de la unión de TCR de moléculas de péptido-MHC relacionadas con la presente descripción, puede proporcionar una solución eficiente para pruebas preclínicas de TCR destinadas al uso clínico.

También en relación con lo anterior, esto permite la determinación de la respuesta del antígeno a bibliotecas de superposición o péptidos muy similares. Algo que no es posible con las actuales tecnologías de multiplexación, como el principio de codificación combinatoria. Esto permite la asignación de la reactividad inmune, por ejemplo, a la variante de mutación de virus, por ejemplo, aunque no de manera exclusiva, al VIH.

En una realización amplia, la presente descripción es el uso de multímeros de MHC etiquetados con código de barras para la evaluación de alto rendimiento de grandes cantidades de células sensibles a antígenos en una sola muestra, el acoplamiento de la respuesta del antígeno a la característica funcional y fenotípica, a la especificidad de TCR y para determinar la unión cuantitativa de grandes bibliotecas de péptido-MHC para un TCR dado.

Si bien la descripción escrita anterior de la descripción permite a un experto en la materia hacer y usar lo que se considera actualmente el mejor modo de hacerlo, los expertos en la materia entenderán y apreciarán la existencia de variaciones, combinaciones y equivalentes de la realización específica de la descripción, el procedimiento y los ejemplos en esta invención.

Elementos adicionales de la descripción:

5 *Elemento 1:* Uso de multímeros de MHC etiquetados con código de barras para la detección multiplex de diferentes especificidades de células T en una sola muestra, lo que permite la detección simultánea de potencialmente más de 1.000 especificidades de células T diferentes, donde la especificidad se revela a través de la secuencia de la etiqueta del código de barras.

10 *Elemento 2:* Uso de multímeros de MHC etiquetados con código de barras en combinación con la clasificación de células individuales y la secuenciación TCR, donde la especificidad del TCR puede determinarse mediante el código de barras adjunto. Esto permitirá la identificación de TCR específicos para una mezcla de numerosos (potencialmente, aunque sin restricción a > 1.000) y diferentes multímeros de péptido-MHC, y hará coincidir la secuencia de TCR con la especificidad del antígeno.

15 *Elemento 3:* Uso de multímeros de MHC etiquetados con código de barras para determinar la afinidad y el motivo de unión de un TCR dado. La estrategia de etiquetado de código de barras permitirá la unión de varios multímeros de péptido-MHC diferentes (relacionados con la secuencia) a una célula T dada, con la afinidad de unión que determina la contribución relativa de cada multímero de péptido-MHC. Así, es posible asignar la secuencia de reconocimiento de especificidad fina/consenso de un TCR dado mediante el uso de bibliotecas de péptidos superpuestos o, por ejemplo, bibliotecas de sustitución de alanina.

20 *Elemento 4:* Uso de multímeros de MHC etiquetados con código de barras para asignar la respuesta del antígeno contra péptidos relacionados/similares de la secuencia en las mismas bibliotecas, por ejemplo, cambios mutacionales en la infección por VIH. Esto no ha sido posible con técnicas anteriores basadas en multímeros de MHC.

25 *Elemento 5:* El uso de multímeros de MHC etiquetados con código de barras para acoplar cualquier característica funcional de una célula T específica o un grupo de células T específicas para el reconocimiento del antígeno (péptido-MHC). Por ejemplo, para determinar qué especificidades de células T en un grupo grande secretan citocinas, liberan calcio u otra medición funcional después de ciertos estímulos.

30 Cabe señalar que las realizaciones y las características descritas en el contexto de uno de los aspectos de la presente descripción también se aplican a los otros aspectos de la descripción.

## Ejemplos

### EJEMPLO 1

35 La Figura 5 muestra resultados que actúan como prueba de principio para la descripción. Figura 5A, Datos de citometría de flujo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos.

### Materiales y procedimientos

40 Las PBMC se tiñeron con multímeros de péptido-MHC específicos de CMV acoplados a un código de barras de nucleótido específico. Además de los reactivos péptido-MHC de CMV, las células se tiñeron en presencia de reactivos de control negativo, es decir, multímeros de MHC de péptido de VIH acoplados a otra etiqueta de código de barras específica y los reactivos adicionales de control negativo de péptido-MHC (p\*) que no contienen un código de barras.  
45 Todos los multímeros se etiquetaron adicionalmente con una etiqueta de fluorescencia de PE. Las cantidades de multímeros de MHC usados para la tinción de PBMC fueron equivalentes a la cantidad requerida para la tinción de 1.000 especificidades diferentes de péptido-MHC, es decir, 1x multímeros de MHC específicos de CMV etiquetados con oligo, 1x multímeros de MHC específicos de VIH etiquetados con oligo y 998x multímeros de p\*MHC no etiquetado, a fin de dar una impresión de si la tinción de fondo interferirá con la verdadera señal positiva. Se incluyeron etapas de lavado prolongadas (ya sean de 0 min (A), 30 min (B) o 60 min (C)) después de eliminar los multímeros de MHC, y se muestran los datos de todos los experimentos. Las células positivas para multímero de PE-MHC se clasificaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).  
50

Figura 5B, Valores de umbral cruzado (Ct) de qPCR multiplex de las células positivas de multímero de PE-MHC clasificadas. La qPCR se usó para evaluar la viabilidad de detectar cierta especificidad celular a través de multímeros de péptido-MHC etiquetados con código de barras. Los reactivos asociados con un código de barras de control positivo (CMV) y un código de barras de control negativo (VIH) estuvieron presentes durante la tinción, pero los multímeros de péptido-MHC de código de barras (VIH) de control negativo evidentemente se lavaron.  
55

60 Los ejemplos de secuencias de ácido nucleico son:

Oligo de código de barras de ADN para la unión del multímero de MHC de CMV:

5GAGATACGTTGACCTCGTTGAANNNNNTCTATCCATTCCATCCAGCTCACTTAAGC  
TCTTGGTTGCAT

Oligo de código de barras de ADN para la unión del multímero de MHC de VIH:

5

5GAGATACGTTGACCTCGTTGAANNNNNTCTATAGGTGTCTACTACCTCACTTAAGC  
TCTTGGTTGCAT

5 = biotina-TEG

## 10 **Resultados**

Los resultados muestran que el valor de Ct solo es detectable para el código de barras asociado al multímero de péptido-MCH de CMV, mientras que el código de barras asociado al multímero de MHC de péptido-VIH no se detectó.

## 15 **Conclusión**

Este experimento es un ejemplo representativo de varios experimentos similares realizados con otras especificidades de antígeno. En general, estos datos muestran que es viable

- 1) teñir con 1.000 multímeros MHC diferentes en una sola muestra mientras se mantiene una señal específica,
- 2) unir un código de barras de ADN a un multímero de MHC,
- 3) amplificar el código de barras de ADN después de las etapas de selección celular,
- 4) leer el código de barras con qPCR, usando sondas específicas de código de barras,
- 5) obtener una señal específica correspondiente a la población de células T específicas de antígeno presente en la muestra, mientras que los códigos de barras de multímero de MHC no específicos no son detectables.

25

En conjunto, estos (y datos similares disponibles) proporcionan una prueba de viabilidad para las etapas descritas en las figuras 1, 2 y 3.

## **EJEMPLO 2**

30

Este ejemplo se refiere a

- i) la estabilidad de los oligonucleótidos de ADN, usados en una realización de la descripción, en preparaciones sanguíneas, y
- ii) una realización de la descripción, en la que ciertos Dextramers marcados (moléculas de detección en las que la molécula de unión es un número de complejos péptido-MHC, y la etiqueta es un oligonucleótido de ADN) se enriquecen. Lo que permite la identificación de los Dextramers con especificidad de unión para ciertas (subpoblaciones de) células en la muestra celular analizada. En i) se muestra que los oligos de ADN son estables durante la manipulación en PBMC y en sangre durante un tiempo que permitirá la tinción, el lavado y el aislamiento de las células T y la posterior amplificación de los marcadores de ADN.

40

En ii) se muestra que un sistema modelo, que consiste en Dextramers marcados con ADN con especificidades de MHC para CMV, gripe y péptido de control negativo, se localizará y puede capturarse/clasificarse con especificidades de células T relevantes, así como también puede identificarse mediante amplificación por PCR y/o secuenciación.

## 45 **A. Estabilidad de oligonucleótidos monocatenarios y bicatenarios en preparaciones sanguíneas**

Diseño de oligo de marcador de ADN. Se prepararon oligos de prueba de 69 nucleótidos de longitud que consisten en la región de cebador 5' (22nt amarillo)-región de código de barras aleatoria (6xN-nt)-región kodon (21nt verde/subrayado)-región de cebador 3' (20nt azul):

50

'b' = Modificación de biotina-TEG 5'

'h' = HEG (modificaciones de terminal)

Primer directo-01 GAGATACGTTGACCTCGTTG

Primer inverso-01 ATGCAACCAAGAGCTTAAGT

55 Oligo de prueba-01

bGAGATACGTTGACCTCGTTGAANNNNNN**TCTATCCATTCCATCCAGCTCACTTAAGC**  
**TCTTGGTTGCAT**

Oligo de prueba-02

bhGAGATACGTTGACCTCGTTGAANNNNNN**TCTATCCATTCCATCCAGCTCACTTAAG**  
**CTCTTGGTTGCAT**

5

Oligo de prueba-03

bhGAGATACGTTGACCTCGTTGAANNNNNN**TCTATCCATTCCATCCAGCTCACTTAAG**  
**CTCTTGGTTGCATh**

10

Oligo de prueba-04

bhGAGATACGTTGACCTCGTTGAANNNNNN**TCTTGAAGTATGAATCGTCTCACTTAAG**  
**CTCTTGGTTGCATh**

15 Oligo de prueba-05

bhGAGATACGTTGACCTCGTTGAANNNNNN**TCTATAGGTGTCTACTACCTCACTTAAG**  
**CTCTTGGTTGCATh**

Oligo de prueba-06

20

bhGAGATACGTTGACCTCGTTGAANNNNNN**TCTTTATTGGAGAGCACGCTCACTTAAG**  
**CTCTTGGTTGCATh**

Sondas Q-PCR para cuantificar la cantidad de los oligos de prueba 1 a 6:  
 + = nucleótido de ARN modificado con ácido nucleico bloqueado (LNA)

25 LNA-3

8 = FAM; 7 = BHQ-1-plus

TCT[+A][+T][+C]A[+T][+T]CC[+A][+T][+C]CAGC

30 LNA-4

8 = FAM; 7 = BHQ-1-plus

TCT[+T][+G][+A]AC[+T][+A]TG[+A][+A][+T]CGTC

35 LNA-5

9 = HEX; 7 = BHQ-1-plus

TCT[+A][+T][+A]GG[+T][+G]TC[+T][+A][+C]TACC

40 LNA-6

2 = Cy5; 1 = BHQ-2-plus

TCT[+T][+T][+A]TT[+G][+G]AG[+A][+G][+C]ACGC

La estabilidad de los marcadores oligo por Q-PCR se analizó en condiciones relevantes para el aislamiento de células T: Los oligos de prueba 1 a 6 se incubaron en sangre anticoagulada con EDTA, y después de la incubación se determinó la cantidad de cada uno de los oligos de prueba usando Q-PCR mediante el uso de los cebadores y las sondas mencionados anteriormente. Los marcadores oligo fueron cuantificados por qPCR con SYBR® Green 5 JumpStart™ Taq ReadyMix™ según el protocolo del fabricante en combinación con cualquier instrumento capilar de qPCR (por ejemplo, Roche LightCycler o Agilent Mx3005P).

Debido a los diferentes términos de los oligos de prueba 1 a 6, esto también fue una prueba de la estabilidad de la etiqueta oligo de ADN no modificada versus extremos 5' modificado de HEG y 5' y 3' modificado de HEG (oligo de prueba-01, -02 y -03 respectivamente).

Los resultados se muestran en la figura 6. Se concluye que la estabilidad de los oligos de prueba es adecuadamente alta para todas las variantes probadas, a fin de efectuar la descripción.

**15 B. Generación y selección de una biblioteca de Dextramer de MHC marcada con ADN de 3 miembros para la detección de células T específicas de antígeno en una muestra de células linfoides.**

Este experimento implica la generación de 3 Dextramers marcados con ADN, cada uno con una especificidad única, de la siguiente manera:

- 20 Dextramer 1: Gripe (HLA-A\*0201/GILGFVFTL/MP/Influenza)
- Dextramer 2: CMV (HLA-A\*0201/NLVPMVATV/pp65/CMV)
- Dextramer 3: Negativo (HLA-A\*0201/ALIAPVHAV/Control negativo).

Por consiguiente, cada uno de estos Dextramers presenta una especificidad de pMHC única (es decir, los tres Dextramers presentan diferentes moléculas de unión), y cada Dextramer transporta una etiqueta única (oligonucleótido de ADN) específica para esa especificidad de pMHC.

La biblioteca de Dextramers marcados con ADN se criba en una preparación de células linfoides como la sangre anticoagulada con EDTA o preparaciones de células mononucleadas de sangre periférica (PBMC). Aquellos Dextramers que se unen a las células de la muestra celular estarán relativamente más enriquecidos que los que no se unen.

Finalmente, la especificidad de MHC/antígeno de los Dextramers enriquecidos se revela mediante la identificación de sus marcadores de ADN por Q-PCR con sondas específicas de marcadores de ADN o mediante la secuenciación de las etiquetas de ADN.

**1. Producción de 3 Dextramers marcados con ADN diferentes con complejos de péptido HLA-A\*0201 (pMHC).**

a. Los complejos de pMHC se generan y se unen al dextrano, junto con marcadores de ADN únicos que identifican cada uno de los complejos de pMHC individuales, como sigue.

40 i. Generación de dextramers marcados con ADN con gripe (HLA-A\*0201/GILGFVFTL/MP/Influenza), CMV (HLA-A\*0201/NLVPMVATV/pp65/CMV) y negativo (HLA-A\*0201/ALIAPVHAV/control negativo).

1. La reserva de Dextramer es de 160 nano molares (nM), la reserva de oligo de prueba se diluye a 500 nM. Mezcle 10 microlitros (µL) de reserva de dextramer 160 nM con 10 µL de reserva de oligo de prueba de 500 nM. Incube durante 10 min a temperatura ambiente. Mezcle con 1,5 µg de complejo pMHC de la especificidad deseada. Ajuste el volumen a 50 µL con un tampón de pH neutro, como PBS o Tris pH 7,4, y almacene a 4 grados Celsius. Esto producirá un Dextramer marcado con ADN con aproximadamente 3 marcadores oligo y 12 complejos pMHC, respectivamente, por Dextramer.

- 45 a. Dex-Oligo-03 = Dextramer con oligo de prueba-03 y HLA-A\*0201/NLVPMVATV/pp65/CMV.
- b. Dex-Oligo-04 = Dextramer con oligo de prueba-04 y HLA-A\*0201/GILGFVFTL/MP/Influenza.
- 50 c. Dex-Oligo-05 = Dextramer con oligo de prueba-05 y HLA-A\*0201/ALIAPVHAV/Control negativo.

**2. Preparación de la muestra de células para la detección de células T específicas de antígeno.**

a. Las muestras de células adecuadas para la identificación de células T específicas de antígeno son preparaciones de células linfoides tales como preparaciones de células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) o sangre anticoagulada. Dichas preparaciones de muestras de células se preparan mediante técnicas estándar que resultan conocidas para una persona con un conocimiento ordinario de la técnica.

55 b. Transfiera en el intervalo de células linfoides 1E7 (de sangre anticoagulada PBMC o EDTA) a un tubo de ensayo de poliestireno de 12 x 75 mm.

60 c. Adicione 2 ml de PBS que contenga suero de ternera fetal al 5%, pH 7,4. Centrifugue a 300 x g durante 5 min. Elimine el sobrenadante y resuspenda las células en un volumen total de 2,5 ml de PBS que contenga 5% de suero de ternera fetal, pH 7,4.

**3. Preparación y modificación de la biblioteca de Dextramers marcados con ADN con tres especificidades de MHC/péptido (a partir de 1).**

a. Mezcle 5 µL de biotina 10 uM con 10 µL de Dex-Oligo-03, Dex-Oligo-04 y Dex-Oligo-05.

**4. Mezcla de preparaciones de células linfoides con una biblioteca de Dextramers de MHC marcados con ADN.**

a. Mezcle las células linfoides 1E7 en 2,5 ml (a partir de 2b) con una biblioteca de 30 µL de Dextramers marcados con ADN (a partir de 3a).

b. Incube durante 30 min a temperatura ambiente.

c. Centrifugue a 300 x g durante 5 min y elimine el sobrenadante.

d. Resuspenda el sedimento en 2,5 ml de PBS que contenga suero de ternera fetal al 5%, pH 7,4. Centrifugue a 300 x g durante 5 min y elimine el sobrenadante.

e. Resuspenda el sedimento en 2,5 ml de PBS que contenga suero de ternera fetal al 5%, pH 7,4

**5. Captura de todas las células T específicas de antígeno CD8+ mediante la clasificación de células asistida por imán, realizada según el catálogo Miltenyi Biotec No. 130-090.878, protocolo de microesferas de CD8 de sangre total.**

a. Adicione 100 µL de microesferas de CD8 de sangre total (catálogo de Miltenyi Biotec No. 130-090.878) a células linfoides resuspendidas de 4e. Mezcle y permita la captura de células T CD8+ durante 15 minutos a temperatura ambiente.

b. Coloque la columna de sangre total en el campo magnético de un separador MACS adecuado. Para más detalles, consulte la hoja de datos del Kit de columna de sangre total.

c. Prepare la columna mediante el enjuague de 3 ml de tampón de separación (autoMACS Running Buffer o PBS que contiene suero de ternera fetal al 5%, pH 7,4).

d. Aplique la suspensión celular etiquetada magnéticamente (4e) en la columna de sangre total preparada. Recoja el flujo que contiene las células no etiquetadas.

e. Lave la columna de sangre total con 3x3 ml de tampón de separación (autoMACS Running Buffer o PBS que contiene suero de ternera fetal al 5%, pH 7,4).

f. Elimine la columna de sangre total del separador y colóquela en un nuevo tubo de recolección.

g. Capture las células T CD8+ pipeteando 5 ml de tampón de elución de columna de sangre total o PBS que contenga suero de ternera fetal al 5%, pH 7,4 en la columna de sangre total. Inmediatamente lave las células etiquetadas magnéticamente empujando firmemente el émbolo hacia la columna.

h. Centrifugue a 300 x g durante 5 min y elimine el sobrenadante. Resuspenda las células CD8+ recogidas en 50 µl y almacene a menos 20 grados centígrados para su posterior análisis.

**6. Identificación de Dextramers que se unen significativamente a las células T específicas de antígeno de la muestra de células linfoides.**

a. Las proporciones de cuantificación de los marcadores oligo de ADN en la entrada (3a) versus la fracción capturada (5h) mediante secuenciación o cuantificación alternativa por qPCR usando las sondas específicas del marcador de ADN LNA-3, LNA-4 y LNA-5 revelarán la abundancia relativa de las células T específicas de antígeno en la muestra de células linfoides.

i. Cuantificación de las proporciones de los marcadores oligo de ADN en la entrada (3a) versus la fracción capturada (5h) por qPCR usando las sondas específicas de etiquetas de ADN LNA-3, LNA-4 y LNA-5.

1. Haga 25 µL de reacciones qPCR de

a. entrada de la biblioteca de Dextramers marcados con ADN (3a)

b. salida de la biblioteca de Dextramers marcados con ADN (5h)

c. Curvas estándares de 10 a 1E8 del oligo de prueba-03, -04 y -05 respectivamente.

2. Mezcle 12,5 µL JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich # D7440) con 0,125 µL de cebador de 100 uM, cada uno del Directo-01 y el Inverso-01, 0,625 µL de una sonda de 10 uM de cualquiera de las siguientes, LNA-3, LNA-4 o LNA-5, 0,025 µL de tinte de referencia (Sigma-Aldrich # R4526) y 12,5 µL de cualquiera de las entradas de la biblioteca de Dextramers marcados con ADN (3a), salida de la biblioteca de Dextramers marcados con ADN (5h) o curvas estándares de 10 a 1E8 del Oligo de prueba-03, -04 y -05 respectivamente.

3. Ejecute el perfil térmico de qPCR de dos etapas: ciclo 1 = 5 minutos a 95 grados Celsius; ciclo 2 a 40 = 30 segundos a 95 grados Celsius y 1 minuto a 60 grados Celsius.

4. Estime la abundancia relativa de células T con especificidad antigénica versus uno de los tres Dextramers de MHC graficando los valores de tiempo de ciclo QPC (Ct) de la entrada de la biblioteca de Dextramers marcados con ADN (3a), la salida de la biblioteca de Dextramers marcados con ADN (5h) en un gráfico de valores de Ct de la curva estándar de qPCR de los Oligos de prueba-03, -04 y -05 respectivamente.

ii. Cuantificación de las proporciones de los marcadores oligo de ADN en la entrada (3a) versus la fracción capturada (5h) por secuenciación ultra profunda.

1. Haga 25 µL de reacciones PCR de

a. entrada de la biblioteca de Dextramers marcados con ADN (3a)

b. salida de la biblioteca de Dextramers marcados con ADN (5h)

2. Mezcle la reacción de PCR usando cualquier mezcla maestra de PCR estándar con un cebador de 1,25 µL de 10 uM, cada uno de Directo-01 y de Inverso-01, y 12,5 µL de cualquier entrada de la biblioteca de Dextramers marcados con ADN (3a) o salida de la biblioteca de Dextramers marcados con ADN (5h). Rellene hasta 25 µL con agua pura. Por ejemplo, use 2x PCR Master Mix de Promega que contenga polimerasa de ADN de Taq, dNTP, MgCl<sub>2</sub> y tampones de reacción.

3. La secuenciación ultra profunda del producto de PCR anterior puede ser proporcionada por varios proveedores comerciales como, por ejemplo, Eurofins Genomics, GATC Biotech o Beckman Coulter Genomics, usando tecnologías de secuenciación de próxima generación bien establecidas como Roche 454, Ion Torrent, la tecnología Illumina o cualquier otra técnica de secuenciación de alto rendimiento para la secuenciación de amplicones por PCR.

4. El análisis por amplicón de PCR de las abundancias relativas de la entrada de la biblioteca de Dextramers etiquetados con ADN (3a), la salida de la biblioteca de Dextramers etiquetados con ADN (5h) revelará la abundancia relativa de células T con especificidad de antígeno contra uno de los tres Dextramers de MHC.

## 7. Resultados previstos y comentarios

a. Se espera que la abundancia relativa y las proporciones de los marcadores oligo de ADN en la entrada de una biblioteca de Dextramers marcados con ADN (3a) según lo estimado por qPCR o secuenciación se vea afectada principalmente por tres parámetros, a saber: i) la relación en la que se suministraron los marcadores oligo de ADN durante la generación de los Dextramers marcados con ADN (1.a.i.1); ii) cómo se mezcló la entrada de la biblioteca (3a); y iii) con qué eficiencia se amplifican los marcadores de oligo de ADN individuales en las reacciones de PCR.

i. En un ejemplo, las relaciones relativas de los marcadores oligo de ADN en la entrada de una biblioteca de Dextramers marcados con ADN como se genera en 3a y como se mide por qPCR o secuenciación serían entre 1 y 10 veces cada uno.

b. Se espera que la abundancia relativa y las proporciones de los marcadores oligo de ADN en la salida de la biblioteca de Dextramers marcados con ADN (5h) según lo estimado por qPCR o secuenciación, además de los tres parámetros mencionados en 7a, se vea afectado principalmente por tres parámetros adicionales, a saber: i) el número de células T específicas de antígeno con especificidad para una de las tres combinaciones MHC-péptido; ii) la afinidad del receptor de células T de la célula T dada por el complejo MHC-péptido dado; y, finalmente, iii) la eficiencia de la separación del antígeno células T específicas de ADN y sus Dextramers de MHC etiquetados con ADN asociado de Dextramers de MHC etiquetados con ADN no unido mediante el lavado y la captura de células.

i. En un ejemplo, las relaciones relativas de los marcadores oligo de ADN en la salida de una biblioteca de Dextramers marcados con ADN como se genera en 5h y medidos por qPCR o secuenciación serían más de 10 veces a favor de esos marcadores oligo de ADN acoplados a un Dextramer de MHC con un complejo MHC-péptido para el cual las células T específicas de antígeno están presentes en la muestra de células linfoides.

1. En una muestra de células linfoides de un donante HLA-A\*0201/NLVPMTATV/pp65/CMV positivo para influenza y CMV positivo con células T específicas de antígeno contra HLA-A\*0201/NLVPMTATV/pp65/CMV y HLA-A\*0201/GILGFVFTL/MP/Influenza y sin antígeno-células T específicas contra HLA-A\*0201/ALIAPVHAV/control negativo, se espera que las relaciones relativas del Oligo de prueba-03 (Dex-Oligo-03 = Dextramer con el Oligo de prueba-03 y HLA-A\*0201/NLVPMTATV/pp65/CMV), el Oligo de prueba-04 (Dex-Oligo-04 = Dextramer con el Oligo de prueba-04 y HLA-A\*0201/GILGFVFTL/MP/Influenza) y el Oligo de prueba-05 (Dex-Oligo-05 = Dextramer con el Oligo de prueba-05 y HLA-A\*0201/ALIAPVHAV/Control negativo) será más de 10 veces a favor del Oligo de prueba-03 y el Oligo de prueba-04 sobre el Oligo de prueba-05. Es decir que se espera que el Oligo de prueba-03 y el Oligo de prueba-04 sea más de 10 veces más abundante o frecuente que el Oligo de prueba-05, medido por secuenciación o qPCR de la salida de la biblioteca de Dextramers marcados con ADN (5h) si se suministraran en cantidades iguales en la entrada de la biblioteca de Dextramers marcados con ADN (3a).

## EJEMPLO 3

Este es un ejemplo en el que la muestra era sangre de un donante positivo para CMV y negativo para VIH que se modificó para generar células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La cadena principal era un conjugado de dextrano con estreptavidina y fluorocromo (cadena principal de Dextramer de Immudex).

Las moléculas de MHC eran complejos péptido-MHC (pMHC) que mostraban CMV (antígeno positivo) o antígeno-péptido derivado de CMV (antígeno negativo). Las moléculas de MHC se modificaron por biotilación para proporcionar una etiqueta de captura de biotina en la molécula de MHC. La molécula de MHC se purificó por HPLC y se controló la calidad en términos de la formación de multímeros de pMHC funcionales para la tinción de una población de células T de control. Las etiquetas de oligonucleótidos fueron sintetizadas por DNA Technology A/S (Dinamarca).

La etiqueta se modificó sintéticamente con un marcador de captura de biotina terminal. Las etiquetas se combinaron con la etiqueta de oligonucleótidos que surge reconociendo un oligonucleótido A (modificado con biotina) para una etiqueta de oligonucleótido B parcialmente complementaria, lo cual fue seguido por una extensión enzimática de la

polimerasa de ADN de Oligo A y Oligo B para crear una etiqueta completamente bicatenaria. La molécula de MHC se sintetizó uniendo moléculas de MHC en forma de pMHC biotinilado y marcadores en forma de oligonucleótido modificado con biotina en una cadena principal de dextrano modificado con estreptavidina. La molécula de MHC contenía además una modificación (5b) en la forma de un fluorocromo. Se generaron dos moléculas de MHC diferentes en las que las dos moléculas de MHC individuales que contenían pMHC diferentes se codificaron mediante etiquetas de oligonucleótidos individuales correspondientes.

Una cantidad de muestra, las PBMC (1b), se incubaron con una cantidad de moléculas de MHC mixtas (5) en condiciones (6c) que permitieron la unión de las moléculas de MHC a las células T en la muestra.

Las moléculas de MHC unidas a las células se separaron de las moléculas de MHC no unidas a las células (7) mediante unas primeras rondas de lavado de los PBMC a través de centrifugación, sedimentación de células y resuspensión en un tampón de lavado, lo cual fue seguido por la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de células etiquetadas con fluorocromo. Las células T que pueden unirse eficientemente a las moléculas de MHC fluorescerán debido al fluorocromo comprendido dentro de las moléculas de MHC; Las células T que no pueden unirse a las moléculas de MHC no fluorescerán. La clasificación de FACS conduce al enriquecimiento de las células fluorescentes y, por tanto, al enriquecimiento de las moléculas de MHC que se unen a las células T de la muestra de PBMC.

Las células aisladas de FACS se sometieron a un análisis cuantitativo por PCR de la etiqueta de oligonucleótido asociado a las moléculas de MHC unidas a las células aisladas para revelar la identidad de las moléculas de MHC que se unían a las células T presentes en la muestra. Este experimento, por consiguiente, revela la presencia de células T en la sangre que expresa un receptor de células T que reconoce/se une a las moléculas de péptido-MHC comprendidas en la biblioteca de péptidos-MHC multiméricos.

1. Preparación de muestras. La muestra de células usada en este experimento se obtuvo preparando PBMC a partir de sangre extraída de un donante que era positivo para CMV y negativo para VIH según lo determinado por la tinción convencional de multímeros de MHC.

a. Adquisición de las muestras: La sangre se obtuvo del Banco de sangre danés  
 b. Modificación de la muestra: Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de la sangre total mediante una centrifugación en gradiente de densidad. El medio gradiente de densidad, Lymphoprep (Axis-Shield), que consiste en polímeros de carbohidratos y un compuesto denso de yodo, facilita la separación de los constituyentes individuales de la sangre. Las muestras de sangre se diluyeron a 1:1 en RPMI (RPMI 1640, GlutaMAX, Hepes 25 mM; gibco-Life technologies) y se colocaron cuidadosamente en capas sobre el Lymphoprep. Después de la centrifugación, 30 min, 490 g, se recogieron las PBMC junto con las plaquetas de la capa intermedia de células. Las células aisladas, la capa leucocitaria (BC), se lavaron dos veces en RPMI y se crioconservaron a -150°C en suero de ternera fetal (FCS; gibco-Life technologies) que contenía dimetilsulfóxido al 10% (DMSO; Sigma-Aldrich). Los BC usados en este ejemplo se enumeran en la tabla 6 junto con sus respectivas especificidades de virus. Sus especificidades de virus habían sido identificadas mediante protocolos convencionales de tinción de multímeros de MHC.

2. Cadena principal Preparación de la cadena principal: La cadena principal es una molécula de dextrano, a la que se ha unido la estreptavidina y los fluorocromos. La estreptavidina sirve como sitios de unión para oligonucleótidos biotinilados y complejos de pMHC biotinilados (molécula de MHC). El fluorocromo permite la separación de células unidas a moléculas de MHC de células no unidas a moléculas de MHC.

a. En este ejemplo, las cadenas principales eran moléculas de dextrano lineales y ramificadas de 1.000 a 2.000 KDa con estreptavidina unida covalentemente (5 a 10 por cadena principal) y fluorocromos (2 a 20 por cadena principal) en forma de PE. Las cadenas principales son esencialmente la cadena principal de Dextramer como lo describe Immudex. En este ejemplo, las cadenas principales también se denominan conjugado SA.

3. Preparación de la molécula de MHC: Las moléculas de MHC usadas en este ejemplo fueron dos complejos de clase I de MHC-péptido diferentes. Las cadenas pesadas de MHC (HLA-A0201 y HLA-B0702) y B2M se expresaron en *E. coli* como se describió anteriormente (Hadrup y col. 2009) y cada una se replegó con dos antígenos peptídicos. Las especificidades individuales (moléculas de péptido-MHC, alelo y epítipo) se generaron de la siguiente manera

a. Síntesis: Las moléculas de MHC en este ejemplo fueron monómeros de pMHC específicos que se produjeron a partir del intercambio UV de monómeros de HLA-I seleccionados que transportan un ligando peptídico de 9 residuos condicional a los rayos UV (p\*). Cuando se expone a la luz UV (366 nm), el ligando condicional se escindiría y dejaría el espacio de unión vacío. Debido a la inestabilidad de las moléculas de MHC-I vacías, los complejos se degradarán rápidamente si no se rescatan mediante el reemplazo con otro péptido que coincida con ese tipo de HLA. De esta manera, se produjeron monómeros de pMHC específicos mezclando el exceso de ligandos de HLA deseados con monómeros de p\*MHC. Los monómeros de p\*MHC se replegaron, biotinilaron y purificaron como se describió anteriormente (Hadrup y col. 2009).

i. El péptido derivado del VIH ILKEPVHGV del antígeno VIH polimerasa y el péptido derivado del CMV TPRVTGGGAM del antígeno pp65 TPR (Pepscan Presto, NL) se diluyeron en una solución salina tamponada



con fosfato (DPBS; Lonza) y se mezclaron en concentraciones finales 100 µg/ml:200 µM (HLA-A02: ILKEPVHGV y HLA-B07:TPRVTGGGAM). Las mezclas se expusieron a luz UV de 366 nm (gabinete UV; CAMAG) durante una hora y, opcionalmente, se almacenaron hasta 24 h a 4°C.

b. Modificación: Sin modificaciones adicionales

5 c. Purificación: El panel de moléculas de MHC se movió a tubos Eppendorf y se centrifugó durante 5 min, en 5000 g, para sedimentar cualquier molécula de MHC que no estuviera en solución, antes de adicionarse a las células.

4. Preparación de la etiqueta: En este ejemplo, se generaron dos oligonucleótidos diferentes, con la misma longitud, pero con una secuencia parcialmente diferente. Cada uno de los oligonucleótidos se unió a un pMHC específico y, por consiguiente, codificó este pMHC específico. Los oligonucleótidos se biotinilaron, lo que permitió una fácil unión a la

10 cadena principal del conjugado de dextrano-estreptavidina.

a. Síntesis: las etiquetas eran oligonucleótidos de ADN que se adquirieron de DNA Technology (Dinamarca) y se entregaron como polvo liofilizado. Se hicieron diluciones de reservas de etiqueta de 100 µM en agua libre de nucleasas y se almacenaron a -20°C.

15 i. La etiqueta usada se denominó sistema de etiqueta 2OS y se desarrolló para aumentar la complejidad de un número limitado de secuencias de oligonucleótidos mediante una estrategia combinatoria de generación de etiquetas, a fin de producir múltiples etiquetas únicas a partir de un número más limitado de precursores de etiquetas. La estrategia, denominada 2OS, implicó el recocido y el alargamiento posterior de dos secuencias de oligonucleótidos parcialmente complementarias (un oligo A y un oligo B) que fomentaron una nueva secuencia de oligonucleótidos única, la cual se aplicó como una etiqueta de oligonucleótidos de ADN. Por

20 ejemplo, combinando 22 secuencias de oligonucleótidos únicas (precursor de etiqueta A) que son, en parte, complementarias a otras 55 secuencias de oligonucleótidos únicas (precursor de etiqueta B) se podría producir una biblioteca combinatoria de 1.210 etiquetas diferentes (Ax + By; por ejemplo, con 100 en la tabla 9).

1. Los oligonucleótidos A y B parcialmente complementarios se recoció para producir dos etiquetas de oligonucleótidos A + B combinados (A1 + B1 para producir A1B1 y A2 + B2 para producir A2B2). Los oligos A y B se mezclaron como se indica en la tabla 3, se calentaron a 65°C durante 2 minutos y se enfriaron lentamente a < 35°C en 15 a 30 minutos. Los oligos recocidos A y B se alargaron como se indica en la tabla

25 3. Los componentes de la reacción de alargamiento se mezclaron justo antes de su uso. Después de mezclar, la reacción se dejó 5 minutos a RT para permitir el alargamiento de los oligonucleótidos recocidos. Los reactivos usados para el recocido (izquierda) y el alargamiento (derecha) de oligonucleótidos

30 parcialmente complementarios se describen en la tabla 3. Los reactivos marcados en cursiva provienen del kit de secuenciación de ADN Sequenase Versión 2.0 (Affymetrix # 70770).

b. Modificación: Todas las etiquetas se diluyeron a concentraciones de trabajo (640 nM) en agua libre de nucleasas con Tween al 0,1%.

c. Purificación: No se efectuaron más purificaciones de etiquetas.

35 5. Preparación de moléculas de MHC: Las moléculas de MHC (pMHC) y las etiquetas (oligonucleótidos) se unieron a la cadena principal (cadena principal de conjugado de dextrano-estreptavidina-fluorocromo), para formar las moléculas de MHC, de tal manera que un pMHC determinado siempre se une a un oligonucleótido dado.

a. Síntesis: Para la preparación de moléculas de MHC, la estructura principal se marcó con la Etiqueta en forma de un oligo AxBx biotinilado antes de la adición de pMHC.

40 i. La creación de moléculas de MHC se realizó mediante la adición de una etiqueta en un exceso de dos veces sobre la cadena principal (2:1 etiqueta:cadena principal) y las moléculas se incubaron al menos durante 30 min a 4°C. Opcionalmente, la cadena principal se almacenó durante hasta 24 h a 4°C después del acoplamiento de la etiqueta. Antes de acoplar las moléculas de MHC, los monómeros de pMHC, estos se centrifugaron durante 5 min, en 3300 g. El conjugado SA (cadena principal de Dextramer, Immudex) con estreptavidina

45 conjugada (SA) y fluorocromo (PE) se dividieron en alícuotas en placas según la tabla 1. Para evitar el precipitado, se adicionaron moléculas de MHC al conjugado SA alícuotado y se incubaron durante 30 min a RT. Después de la formación del complejo, se adicionaron D-biotina (Avidity Bio200) junto con Na<sub>2</sub>N al 0,02% en PBS a la concentración final de monómero de pMHC que figura en la tabla 1, y se procedió a la incubación durante al menos 30 min o hasta 24 h a 4°C. Las moléculas de MHC ensambladas se almacenaron hasta

50 cuatro semanas a 4°C. Se generaron dos conjuntos de dos moléculas de MHC. Cada conjunto con las dos especificidades etiquetadas individualmente. La etiqueta se invirtió entre los dos conjuntos como se describe a continuación.

1. PMHC específicos de 1xCMV acoplados a 2OS-A1B1, 1x pMHC específicos de VIH acoplados a 2OS-A2B2

55 2. PMHC específicos de 1xCMV acoplados a 2OS-A2B2, 1x pMHC específicos de VIH acoplados a 2OS-A1B1.

b. Modificación: No se efectuaron modificaciones adicionales

c. Purificación: Las moléculas de MHC se centrifugaron durante 5 min, en 3300 g, para sedimentar cualquier molécula de MHC que no estuviera en solución, antes de adicionarse a la muestra.

60 6. Incubación de la muestra y las moléculas de MHC: La muestra de células y las moléculas de MHC se mezclaron en un recipiente, a fin de permitir que las moléculas de MHC se unan a las células T que reconocen.

a. Cantidad de muestra: Se usaron 1x10<sup>6</sup>-2x10<sup>6</sup> células en forma de BC.

b. Cantidad de moléculas de MHC: Según la tabla 1. Se requirió 1 ug/ml calculado en relación con cada molécula de MHC (molécula péptido-MHC) por incubación

c. Condiciones: Los BC se descongelaron en 10 ml, a 37°C, RPMI, con el 10% de suero fetal bovino (FBS), se centrifugaron durante 5 min, en 490 g, y se lavaron dos veces en 10 ml de RPMI con el 10% de FBS. Todo el lavado posterior de las células se refiere a la centrifugación durante 5 min, en 490 g, con la posterior eliminación del sobrenadante. 2x10E6 células se lavaron en un tampón de código de barras de 200 µL (PBS/BSA al 0,5%/EDTA 2 mM/100 µg/ml de ADN de arenque) y se resuspendieron en este tampón a aproximadamente 20 µl por tinción. Antes de la incubación de las células con moléculas de MHC, las células se incubaron con dasatinib 50 nM, durante 30 min, a 37°C (Lissina y col. 2009). Las moléculas de MHC se centrifugaron durante 5 minutos, en 3300 g, antes de la adición a las células. Se requirió 1 ug/ml 5 de cada molécula de MHC (por pMHC) por incubación. Después de adicionar las moléculas de MHC, las células se incubaron durante 15 min, a 37°C. La mezcla de anticuerpos enumerada en la tabla 2 se adicionó junto con 0,1 µl de tinte de viabilidad de IR cercano (Invitrogen L10119) que tiñe las aminos libres. La tinción de anticuerpos fue esencialmente como la tinción de multímero de MHC convencional. Las células se incubaron durante 30 min, a 4°C. Luego se lavaron las células dos veces en 200 µL de tampón de código de barras y se incubaron en 200 ul de paraformaldehído al 1% en una solución salina tamponada con fosfato (DPBS; Lonza) durante la noche a 4°C.

7. Enriquecimiento de moléculas de MHC con características deseadas: En este ejemplo, las moléculas de MHC se enriquecieron usando citometría de flujo, más específicamente, una clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Las moléculas de MHC transportan un fluorocromo. Por tanto, las células que se unen a las moléculas de MHC fluorescerán, y, mediante un clasificador FACS, pueden separarse de las células que no se unen a las moléculas de MHC y, por lo tanto, no fluorescen. Como resultado, las moléculas de MHC que se unen a las células se enriquecerán.

a. Aplicar: Las células se clasificaron en un BD FACSAria, equipado con tres láseres (de 488 nm azul, de 633 nm rojo y de 405 violeta). El análisis de datos de citometría de flujo se realizó usando el software BD FACSDiva versión 6.1.2. Se aplicó la siguiente estrategia de activación. Los linfocitos se identificaron en una gráfico FSC/SSC. Se usaron compuertas adicionales en células individuales (FSC-A/FSC-H), células vivas (tinte negativo con viabilidad de IR cercano) y células CD4, CD14, CD16, CD19, CD40 negativas (FITC)/CD8 positivas (PerCP) para definir la población de células T CD8 (tabla 2). Las células que estaban unidas a la molécula de MHC se definieron dentro de la población positiva de PerCP

b. Lavado: Las células se lavaron dos veces en un tampón de código de barras donde después las células estaban listas para la adquisición por citometría de flujo. Opcionalmente, las células se fijaron en paraformaldehído al 1%, 4°C, y se lavaron dos veces en un tampón de código de barras. Las células fijas se almacenaron durante un tiempo de hasta una semana a 4°C.

c. Separado: Opcionalmente, las células se adquirieron hasta una semana después de la fijación en paraformaldehído al 1%. Las células positivas para multímeros se clasificaron por FACS, como se describe en 7a, en tubos que se habían saturado previamente para 2h-ON en BSA al 2% y contenían 200 µl de tampón de código de barras para aumentar la estabilidad de los oligonucleótidos que siguieron con las células clasificadas. Las células positivas para fluorocromo (PE) clasificadas se centrifugaron durante 5 min, en 5000 g, a fin de permitir la eliminación de todo el exceso de tampón. Las células se almacenaron a -80°C.

8. Identificación de moléculas de MHC enriquecidas: Al identificar la etiqueta (en este ejemplo, la etiqueta del oligonucleótido), se pudieron identificar los pMHC que unían las células. Por lo tanto, los oligonucleótidos que estaban comprendidos dentro de las moléculas de MHC que se recuperaron con las células, se analizaron por PCR cuantitativa usando sondas Q-PCR específicas de la etiqueta. Esto permitió la identificación de pMHC que unían las células de la muestra celular.

a. Las etiquetas derivadas de las células clasificadas se analizaron por qPCR según la tabla 4. La qPCR se realizó con el kit: Kit de mezcla maestra Brilliant II QRT\_PCR Low ROX Master (Agilent technologies, # 600837). El perfil térmico se enumera en la tabla 5. La PCR se ejecutó en el termociclador: Mx3000P qPCR system (Agilent Technologies).

### 50 **Resultados y conclusiones sobre el Ejemplo 3**

Después de clasificar y efectuar la qPCR, los valores de Ct resultantes confirmaron que las etiquetas se recuperaron con éxito y se enriquecieron solo cuando se asociaron al epítipo de CMV, mientras que no se detectaron cuando se asociaron al epítipo de VIH (figura 7).

Por consiguiente, se verificó que las etiquetas 2OS se recuperaron después de la interacción celular, la clasificación y la qPCR, solo las células T que reconocían la molécula de pMHC dada estaban presentes en la muestra.

#### 60 **Figura 7:**

Detección de una especificidad B7 CMV pp65 TPR entre dextramers de pMHC con código de barras de control negativo. Un código de barras 2OS único se asoció a los reactivos de control positivo en 1., mientras que otro código

de barras 2OS único se asoció con los reactivos de control positivo en 2. El código de barras de repuesto en cada experimento se asoció al reactivo de control negativo para VIH. **A**, Representación gráfica de puntos que muestra la población PE positiva después de la tinción con los multímeros de pMHC VIH y CMV que llevan códigos de barras 2OS separados. **B**, Valores de Ct de qPCR multiplex de las células positivas de dextramers de PE-pMHC clasificadas.

5 Las células se tiñeron con 1. y 2. respectivamente. Los reactivos asociados con un código de barras 2OS de control positivo (CMV) y un código de barras 2OS de control negativo (VIH) estuvieron presentes durante la tinción, pero el dextramer de pMHC con código de barras de control negativo (VIH) evidentemente se lavó. Los resultados obtenidos de dos experimentos individuales se presentan en barras separadas. Se aplicaron aproximadamente 200 células en cada PCR por separado. La qPCR se ejecutó por duplicado y los valores de Ct se muestran como media  $\pm$  intervalo

10 de duplicados.

#### **Ejemplo 4**

Este es un ejemplo en el que la muestra (1) era sangre de un donante positivo para CMV y negativo para VIH que se modificó (1b) para generar células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

La cadena principal (2) era un conjugado de dextrano con estreptavidina y fluorocromo (cadena principal de dextramers de Immudex).

20 El ejemplo es similar al ejemplo 1, excepto que se incluyó un exceso de 1.000 veces de moléculas de MHC con moléculas de MHC irrelevantes, pero sin etiqueta. Las moléculas de MHC usas (3) son complejos péptido-MHC (pMHC) que muestran CMV (antígeno positivo) o péptido-antígenos derivados del VIH (antígeno negativo) o complejos pMHC que muestran un antígeno peptídico irrelevante. Las moléculas de MHC se modificaron (3b) por biotilación para proporcionar una etiqueta de captura de biotina en la molécula de MHC. Las moléculas de MHC se purificaron (2c) mediante HPLC. Las etiquetas (4) eran oligonucleótidos. Los oligonucleótidos fueron sintetizados (4a) por DNA Technology A/S (Dinamarca). Las etiquetas se modificaron sintéticamente (4b) con un marcador de captura de biotina terminal.

30 La molécula de MHC (5) se sintetizó (5a) uniendo moléculas de MHC en forma de pMHC biotilado y etiquetas en forma de oligonucleótido modificado con biotina en una cadena principal de dextrano modificado con estreptavidina. La molécula de MHC contenía además una modificación (5b) en la forma de un fluorocromo. Se generaron tres moléculas de MHC diferentes en las que las dos moléculas de MHC individuales que contenían pMHC dirigido por CMV y VIH se codificaron mediante etiquetas de oligonucleótidos individuales correspondientes. Las moléculas de MHC con moléculas de MHC irrelevantes no se codificaron con una etiqueta oligonucleotídica. Se incubó una cantidad

35 de muestra, PBMC (1b), con una cantidad de moléculas de MHC mezcladas (5) en una proporción de 1:1 y además se incluyeron 1.000 veces de cadena principal etiquetada de p\*MHC sin marcar en condiciones (6c) que permitieron la unión de moléculas de MHC a células T en la muestra.

40 Las moléculas de MHC unidas a las células se separaron de las moléculas de MHC no unidas a las células (7) mediante unas primeras rondas de lavado de los PBMC a través de centrifugación, sedimentación de células y resuspensión en un tampón de lavado, lo cual fue seguido por la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de células etiquetadas con fluorocromo. Las células T que pueden unirse eficientemente a las moléculas de MHC fluorescerán debido al fluorocromo comprendido dentro de las moléculas de MHC; Las células T que no pueden unirse a las moléculas de MHC no fluorescerán. La clasificación de FACS conduce al enriquecimiento de las células

45 fluorescentes y, por tanto, al enriquecimiento de las moléculas de MHC que se unen a las células T de la muestra de PBMC.

Las células aisladas de FACS se sometieron a un análisis cuantitativo por PCR de la etiqueta de oligonucleótido asociado a las moléculas de MHC unidas a las células aisladas para revelar la identidad de las moléculas de MHC

50 que se unían a las células T presentes en la muestra.

Este experimento reveló, por consiguiente, la especificidad péptido-MHC de los receptores de células T de las células T presentes en la muestra de sangre. Además, reveló la viabilidad de enriquecer las células T específicas para el antígeno CMV (positivo) sobre el antígeno VIH (negativo) y un exceso de molécula de MHC que muestra antígenos

55 peptídicos irrelevantes.

1. Preparación de muestras. La muestra de células usada en este experimento se obtuvo preparando PBMC a partir de sangre extraída de un donante que era positivo para CMV y negativo para VIH según lo determinado por la tinción convencional de multímeros de MHC.

60 a. Adquisición de las muestras: La sangre se obtuvo del Banco de sangre danés  
 b. Modificación de la muestra: Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de la sangre total mediante una centrifugación en gradiente de densidad. El medio gradiente de densidad, Lymphoprep (Axis-

- Shield), que consiste en polímeros de carbohidratos y un compuesto denso de yodo, facilita la separación de los constituyentes individuales de la sangre. Las muestras de sangre se diluyeron a 1:1 en RPMI (RPMI 1640, GlutaMAX, Hepes 25 mM; gibco-Life technologies) y se colocaron cuidadosamente en capas sobre el Lymphoprep. Después de la centrifugación, 30 min, 490 g, se recogieron las PBMC junto con las plaquetas de la capa intermedia
- 5 de células. Las células aisladas, la capa leucocitaria (BC), se lavaron dos veces en RPMI y se crioconservaron a -150°C en suero de ternera fetal (FCS; gibco-Life technologies) que contenía dimetilsulfóxido al 10% (DMSO; Sigma-Aldrich). Los BC usados en este ejemplo se enumeran en la tabla 6 junto con sus respectivas especificidades de virus. Sus especificidades de virus habían sido identificadas mediante protocolos convencionales de tinción de multímeros de MHC.
- 10 2. Preparación de la cadena principal: La cadena principal usada en este ejemplo es una molécula de dextrano, a la que se han unido estreptavidina y fluorocromos. La estreptavidina sirve como sitios de unión para oligonucleótidos biotinilados (Etiqueta) y complejos de pMHC biotinilados (moléculas de MHC). El fluorocromo permite la separación de células unidas a moléculas de MHC y células no unidas a moléculas de MHC.
- 15 a. En este ejemplo, las cadenas principales eran moléculas de dextrano lineales y ramificadas de 1.000 a 2.000 kDa con estreptavidina unida covalentemente (5 a 10 por cadena principal) y fluorocromos (2 a 20 por cadena principal) en forma de PE. Las cadenas principales son esencialmente la cadena principal de Dextramer como lo describe Immudex. En este ejemplo, las cadenas principales también se denominan conjugado SA.
3. Preparación de moléculas de MHC: Las moléculas de MHC usadas en este ejemplo fueron dos complejos de clase I de MHC-péptido diferentes. Las cadenas pesadas de MHC (HLA-A02 y HLA-B07) y B2M se expresaron en E. coli como se describió anteriormente (Hadrup y col. 2009) y cada una se replegó con dos antígenos peptídicos. Las especificidades individuales (combinación de alelo y epítipo) se generaron de la siguiente manera.
- 20 a. Síntesis: A en el experimento 1.  
i. Como en el experimento 1  
b. Modificación: Sin modificaciones adicionales
- 25 c. Purificación: como en el experimento 1
4. Preparación de la etiqueta: En este experimento, se generaron dos oligonucleótidos diferentes, con la misma longitud, pero con una secuencia parcialmente diferente. Cada uno de los oligonucleótidos se une a un pMHC específico y, por consiguiente, codifica este pMHC específico. Los oligonucleótidos se biotinilaron, lo que permitió una fácil unión a la cadena principal del conjugado de dextrano-estreptavidina.
- 30 a. Síntesis: En este ejemplo, las etiquetas eran oligonucleótidos de ADN que se adquirieron de DNA Technology (Dinamarca) y se entregaron como polvo liofilizado. Se hicieron diluciones de reservas de etiqueta de 100 µM en agua libre de nucleasas y se almacenaron a -20°C.  
i. Como en el experimento 1  
ii. Los oligonucleótidos A y B parcialmente complementarios se recocieron para producir dos etiquetas de
- 35 oligonucleótidos A + B combinados (A1 + B1 para producir A1B1 y A2 + B2 para producir A2B2). Los oligos A y B se mezclaron como se indica en la tabla 3, se calentaron a 65°C durante 2 minutos y se enfriaron lentamente a < 35°C en 15 a 30 minutos. Los oligos recocidos A y B se alargaron como se indica en la tabla 3. Los componentes de la reacción de alargamiento se mezclaron justo antes de su uso. Después de mezclar, la reacción se dejó 5 minutos a RT para permitir el alargamiento de los oligonucleótidos recocidos. Los reactivos
- 40 usados para el recocido (izquierda) y el alargamiento (derecha) de oligonucleótidos parcialmente complementarios se describen en la tabla 3. Los reactivos marcados en cursiva provienen del kit de secuenciación de ADN Sequenase Versión 2.0 (Affymetrix # 70770).
- b. Modificación: Todas las etiquetas se diluyeron a concentraciones de trabajo (640 nM) en agua libre de nucleasas con Tween al 0,1%.
- 45 c. Purificación: No se efectuaron más purificaciones de etiquetas.
5. Preparación de moléculas de MHC: Las moléculas de MHC (pMHC) y las etiquetas (oligonucleótidos) se unieron a la cadena principal (conjugado de dextrano-estreptavidina-fluorocromo), para formar las moléculas de MHC, de tal manera que un pMHC determinado siempre se une a un oligonucleótido dado.
- 50 a. Síntesis: Para la preparación de moléculas de MHC, la estructura principal se marcó con la Etiqueta en forma de un oligo AxBx biotinilado antes de la adición de pMHC.  
i. La creación de moléculas de MHC se realizó mediante la adición de una etiqueta en un exceso de dos veces sobre la cadena principal (2:1 etiqueta:cadena principal) y se incubaron durante 30 min a 4°C. Antes de acoplar las moléculas de MHC, los monómeros de pMHC, estos se centrifugaron durante 5 min, en 3300 g. El conjugado SA (cadena principal de Dextramer, Immudex) con estreptavidina conjugada (SA) y fluorocromo (PE) se dividieron en alícuotas en tubos según la tabla 1. Para evitar el precipitado, se adicionaron moléculas de MHC al conjugado SA alícuotado y se incubaron durante 30 min a RT. Después de la formación del complejo, se adicionó D-biotina (Avidity Bio200) junto con NaN2 al 0,02% en PBS a la concentración final de monómero
- 55 de pMHC que figura en la tabla 1, y se procedió a la incubación durante 30 min a 4°C. Las moléculas de MHC ensambladas se almacenaron hasta cuatro semanas a 4°C. Se generaron dos conjuntos de dos moléculas de MHC. Cada conjunto con las dos especificidades etiquetadas individualmente. La etiqueta se invirtió entre los
- 60 dos conjuntos como se describe a continuación.  
1. iv. PMHC específicos de 1xCMV acoplados a 2OS-A1B1, 1x pMHC específicos de VIH acoplados a 2OS-

## A2B2

2. v. PMHC específicos de 1xCMV acoplados a 2OS-A2B2, 1x pMHC específicos de VIH acoplados a 2OS-A1B1.

b. Modificación: No se efectuaron modificaciones adicionales

- 5 c. Purificación: Las moléculas de MHC se centrifugaron durante 5 min, en 5.000 g, para sedimentar cualquier molécula de MHC que no estuviera en solución, antes de adicionarse a la muestra.
6. Incubación de la muestra y las moléculas de MHC: La muestra de células y las moléculas de MHC se mezclaron en un recipiente, a fin de permitir que las moléculas de MHC se unan a las células T que reconocen.
- 10 a. Cantidad de muestra: Se usaron  $1 \times 10^6$ - $2 \times 10^6$  células en forma de BC.
- b. Cantidad de moléculas de MHC: Según la tabla 1. Se requirieron 5  $\mu$ L de cada molécula de MHC por incubación (1  $\mu$ g/ml con respecto al pMHC)
- 15 c. Condiciones: Los BC se descongelaron en 10 ml, a 37°C, RPMI, con el 10% de suero fetal bovino (FBS), se centrifugaron durante 5 min, en 1.500 g, y se lavaron dos veces en 10 ml de RPMI con el 10% de FBS. Todo el lavado posterior de las células se refiere a la centrifugación durante 5 min, en 490 g, con la posterior eliminación del sobrenadante.  $1 \times 10^6$ - $2 \times 10^6$  células se lavaron en un tampón de código de barras (PBS/BSA al 0,5%/EDTA 2 mM/100  $\mu$ g/ml de ADN de arenque) y se resuspendieron en este tampón a aproximadamente 20  $\mu$ l por tinción. Antes de la incubación de las células con moléculas de MHC, las células se incubaron con dasatinib 50 nM durante 30 min a 37°C. Las moléculas de MHC se centrifugaron durante 5 minutos, 3300 g, antes de la adición a las células. Se requirieron 5  $\mu$ L de cada molécula de MHC por incubación (1  $\mu$ g/ml con respecto al pMHC). Después de
- 20 adicionar las moléculas de MHC, las células se incubaron durante 15 min, a 37°C. La mezcla de anticuerpos enumerada en la tabla 2 se adicionó junto con 0,1  $\mu$ l de tinte de viabilidad de IR cercano (Invitrogen L10119) que tiñe las aminas libres. La tinción de anticuerpos fue esencialmente como la tinción de multímero de MHC convencional. Las células se incubaron durante 30 min a 4°C.
7. Enriquecimiento de moléculas de MHC con características deseadas: En este ejemplo, las moléculas de MHC se
- 25 enriquecieron usando citometría de flujo, más específicamente, un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS). Las moléculas de MHC transportan un fluorocromo. Por tanto, las células que se unen a las moléculas de MHC fluorescerán, y pueden separarse de las células que no se unen a las moléculas de MHC y, por lo tanto, no fluorescen, mediante un clasificador FACS. Como resultado, las moléculas de MHC que se unen a las células se enriquecerán.
- 30 a. Aplicar: Se usaron dos citómetros de flujo diferentes para la adquisición. Un BD FACSCanto II equipado con tres láseres (de 488 nm azul, de 633 nm rojo y de 405 violeta) y un citómetro BD LSR II equipado con cinco láseres. Solo se usaron cuatro láseres en el LSR II a lo largo de este estudio (láser azul de 488 nm, láser rojo de 640 nm, láser UV de 355 nm y láser violeta de 405 nm). Adicionalmente, las células se clasificaron en BD FACSAria y FACSAria II, equipados con tres láseres (de 488 nm azul, de 633 nm rojo y de 405 violeta). Todos los análisis de
- 35 datos de citometría de flujo se efectuaron usando el software BD FACSDiva versión 6.1.2. Se usó la siguiente estrategia de activación. Todas las recolecciones iniciales de células CD8 positivas se efectuaron por igual. Los linfocitos se identificaron en un gráfico FSC/SSC. Se usaron compuertas adicionales en células individuales (FSC-A/FSC-H), células vivas (tinte negativo de viabilidad de IR cercano) y células negativas de canal de descarga/CD8 positivas (FITC/PerCP) para definir la población de células T CD8.
- 40 b. Lavado: Las células se lavaron dos veces en un tampón de código de barras donde después las células estaban listas para la adquisición por citometría de flujo. Opcionalmente, las células se fijaron en paraformaldehído al 1%, 4°C, y se lavaron dos veces en un tampón de FACS o un tampón de código de barras. Las células fijas se almacenaron durante un tiempo de hasta una semana a 4°C.
- 45 c. Separado: Opcionalmente, las células se adquirieron hasta una semana después de la fijación en paraformaldehído al 1%. Las células positivas para multímeros se clasificaron por FACS, como se describe en 7a, en tubos que se habían saturado previamente para 2h-ON en BSA al 2% y contenían 200  $\mu$ l de tampón de código de barras para aumentar la estabilidad de los oligonucleótidos que siguieron con las células clasificadas. Las células positivas para fluorocromo (PE) clasificadas se centrifugaron durante 5 min, en 5000 g, a fin de permitir la eliminación de todo el exceso de tampón. Las células se almacenaron a -80°C.
- 50 8. Identificación de moléculas de MHC enriquecidas: Al identificar la etiqueta (en este ejemplo, la etiqueta del oligonucleótido), se pudieron identificar los pMHC que unían las células. Por lo tanto, los oligonucleótidos que estaban comprendidos dentro de las moléculas de MHC que se recuperaron con las células, se analizaron por PCR cuantitativa usando sondas Q-PCR específicas de la etiqueta. Esto permitió la identificación de pMHC que unían las células de la muestra celular.
- 55 a. Las etiquetas derivadas de las células clasificadas se analizaron por qPCR como en el experimento 1.

#### **Resultados y conclusiones sobre el Ejemplo 4**

- 60 Después de clasificar y qPCR, los valores de Ct resultantes confirmaron que las etiquetas se recuperaron y enriquecieron con éxito solo cuando se asociaron con el epítipo de CMV, mientras que no se detectaron cuando se asociaron con el epítipo de VIH (figura 8).

Se verificó que las etiquetas 2OS se recuperaron después de la interacción celular, la clasificación y la qPCR, solo si estaban asociadas a reactivos de control positivo.

### Figura 8.

5 Detección de una especificidad de CMV entre dextramers de pMHC con código de barras de control negativo. Un código de barras único se asocia a los reactivos de control positivo en 1., mientras que otro código de barras único se asocia a los reactivos de control positivo en 2. El código de barras de repuesto en cada experimento se asocia al reactivo de control negativo para VIH. Además, están presentes 998x reactivos de control negativo no etiquetados  
10 tanto en 1. como en 2.

**A**, valores de Ct de qPCR multiplex de las células positivas de dextramer PE-pMHC clasificadas. Las células se tiñeron con 1. y 2. respectivamente. Los reactivos asociados con un código de barras de control positivo (CMV) y un código de barras de control negativo (VIH) estuvieron presentes durante la tinción, pero el dextramer de pMHC con código  
15 de barras de control negativo (VIH) evidentemente se lavó.

Aproximadamente 575 células se analizaron en cada qPCR separado.**B**. El número estimado de códigos de barras enlazados por célula en relación con los valores de Ct obtenidos. Es evidente que existen algunas diferencias en los valores de Ct que se muestran en B, aun cuando el mismo número de células estaba presente en todas las qPCR.  
20 Sin embargo, esto se nivela cuando los valores se normalizan con respecto a sus sondas específicas. La qPCR se ejecutó por duplicado, mostrando en este documento la media  $\pm$  intervalo de duplicados.

### Ejemplo 5

25 Este es un ejemplo en el que la muestra (1) era sangre que se modificó (1b) para generar células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

La cadena principal (2) era un conjugado de dextrano con estreptavidina y fluorocromo (cadena principal de dextramers de Immudex).

30 Las moléculas de MHC (3) son complejos péptido-MHC (pMHC) que muestran un antígeno péptido-antígeno de 8 a 10 aminoácidos. La molécula de MHC se modificó (3b) por biotilación para proporcionar una etiqueta de captura de biotina en la molécula de MHC. La molécula de MHC se purificó (2c) mediante HPLC. La etiqueta (4) era un oligonucleótido. La etiqueta oligonucleotídica se sintetizó (4a) mediante DNA Technology A/S (Dinamarca) y se  
35 modificó sintéticamente (4b) con un marcador de captura de biotina terminal. En partes del ejemplo, la etiqueta oligonucleotídica se modificó adicionalmente mediante el recocido para una etiqueta oligonucleotídica parcialmente complementaria, dando lugar a una etiqueta oligonucleotídica combinada.

La molécula de MHC (5) se sintetizó (5a) uniendo moléculas de MHC en la forma de pMHC biotilado y etiquetas en  
40 la forma de un oligonucleótido modificado con biotina en una cadena principal de dextrano modificado con estreptavidina (cadena principal de Dextramer de Immudex, Dinamarca). La molécula de MHC contiene además una modificación (5b) en la forma de un fluorocromo. Se generó una biblioteca de 110 moléculas de MHC diferentes, en las que las moléculas de MHC individuales que contenían diferentes pMHC se codificaron mediante etiquetas oligonucleotídicas individuales correspondientes.

45 Se incubó una cantidad de muestra, PBMC (1b), con una cantidad de una biblioteca de moléculas de MHC (5) en condiciones (6c) (por ejemplo, tiempo de incubación, tampón, pH y temperatura) permitiendo la unión de moléculas de MHC a las células T en la muestra.

50 Las moléculas de MHC unidas a las células se separaron de las moléculas de MHC no unidas a las células (7) mediante unas primeras rondas de lavado de los PBMC a través de centrifugación, sedimentación de células y resuspensión en un tampón de lavado, lo cual fue seguido por la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de células etiquetadas con fluorocromo. Las células T que pueden unirse eficientemente a las moléculas de MHC fluorescerán debido al fluorocromo comprendido dentro de las moléculas de MHC; Las células T que no pueden  
55 unirse a las moléculas de MHC no fluorescerán. La clasificación de FACS conduce al enriquecimiento de las células fluorescentes y, por tanto, al enriquecimiento de las moléculas de MHC que se unen a las células T de la muestra de PBMC.

Las células aisladas de FACS se sometieron a amplificación por PCR de la etiqueta de oligonucleótidos asociada con  
60 las moléculas de MHC unidas a las células. La secuenciación posterior de fragmentos de ADN individuales generados por la reacción de PCR reveló la identidad de las moléculas de MHC que se unían a las células T presentes en la muestra.

Este experimento reveló, por consiguiente, la especificidad péptido-MHC de los receptores de células T de las células T presentes en la muestra de sangre.

- 5 1. Preparación de muestras. La muestra de células usada en este experimento se obtuvo mezclando sangre extraída de 2 donantes diferentes BC 260 y 171 (tabla 6). Para proporcionar una valoración de las respuestas B0702 CMV pp65 TPR en una muestra de donante negativo B0702. Se efectuó una dilución de 5 veces de BC 260 en 171, es decir, 100, 20, 5, 1, 0,2, 0,04, 0,0125, 0,0025% de BC 260 correspondiente a una frecuencia teórica de células específicas del 5, el 1, el 0,2, el 0,04, el 0,008, el 0,0016 y el 0,00032% de B0702 CMV pp65 TPR. Por consiguiente,
- 10 la sensibilidad del procedimiento, así como la relevancia de los resultados obtenidos en el experimento, podrían evaluarse al final del experimento, en comparación con los datos obtenidos en paralelo, usando otros procedimientos, pero células similares.
- a. Adquisición de las muestras: La sangre se obtuvo del Banco de sangre danés.
  - b. Modificación de la muestra:
    - 15 i. Como en el experimento 1
    - ii. Mezcla de dos muestras de sangre como se describió anteriormente
2. Preparación de la cadena principal: como en el experimento 1
3. Preparación de moléculas de MHC: Las moléculas de MHC usadas en este ejemplo fueron complejos de clase I de MHC-péptido. Las especificaciones individuales (combinación de alelo y epítipo) se generaron como se describe en el experimento 1. Aquí usamos una biblioteca de 110 moléculas de péptido MHC diferentes, correspondientes a la tabla 10.
- a. Síntesis: Como se describe en el experimento 1
    - i. Tanto la cadena pesada del MHC como la B2M se expresaron en *E. coli* como se describió anteriormente (Hadrup y col. 2009).
    - 25 ii) Los monómeros de p\*MHC se replegaron y purificaron como se describió anteriormente (Hadrup y col. 2009)
  - b. Modificación: El ligando peptídico condicional a UV p\* se intercambió con los antígenos peptídicos a explorar para producir monómeros de péptido MHC específicos.
    - i. Los péptidos (Pepscan Presto) se diluyeron en una solución salina tamponada con fosfato (DPBS; Lonza) y se mezclaron a concentraciones finales de 100 µg/ml:200 µM (monómero:péptido) en pocillos individuales de placas de 384 pocillos. Se prepararon volúmenes máximos de 70 µl en los respectivos formatos de pocillos. Las mezclas se expusieron a luz UV de 366 nm (gabinete UV; CAMAG) durante una hora y, opcionalmente, se almacenaron hasta 24 h a 4°C.
    - 30
  - c. Purificación: como en el experimento 2
4. Preparación de la etiqueta: En este ejemplo, se generaron 110 oligonucleótidos diferentes, con la misma longitud, pero con una secuencia diferente. Cada uno de los oligonucleótidos se unió a un pMHC específico y, por consiguiente, codificó este pMHC específico. Los oligonucleótidos se biotinilaron, lo que permitió una fácil unión a la cadena principal del conjugado de dextrano-estreptavidina.
- a. Síntesis: En este ejemplo, las etiquetas eran oligonucleótidos de ADN que se adquirieron de DNA Technology (Dinamarca) y se entregaron como polvo liofilizado. Se hicieron diluciones de reservas de 100 µM en agua libre de nucleasas y se almacenaron a -20°C. Se usaron dos tipos de etiquetas de oligonucleótidos de ADN y se denominaron 1OS y 2OS respectivamente.
    - i. Se ordenaron 120 etiquetas 1OS de DNA Technology como oligonucleótidos de ADN monocatenarios con modificación de biotilación 5'. Las etiquetas se diluyeron a concentraciones de trabajo (640 nM) en agua libre de nucleasas con Tween al 0,1%. Véanse las tablas 9 y 10 para las secuencias de etiquetas 1OS.
    - 45 ii. Se desarrolló un sistema de etiqueta 2OS para aumentar la complejidad de un número limitado de secuencias de oligonucleótidos mediante una estrategia combinatoria de generación de etiquetas, a fin de producir múltiples etiquetas únicas a partir de un número más limitado de precursores de etiquetas. La estrategia, denominada 2OS, implicó el recocido y el alargamiento posterior de dos secuencias de oligonucleótidos parcialmente complementarias que fomentaron una nueva secuencia de oligonucleótidos única, la cual se aplicó como una etiqueta de oligonucleótidos de ADN (tabla 9 + 10). Por ejemplo, combinando 20 secuencias de oligonucleótidos únicas (precursor de etiqueta A) que son, en parte, complementarias a otras 60 secuencias de oligonucleótidos únicas (precursor de etiqueta B) se podría producir una biblioteca combinatoria de 1.200 etiquetas diferentes (Ax + By).
      - 50
      1. Los oligonucleótidos A y B parcialmente complementarios se hibridaron para producir una etiqueta de oligonucleótidos A + B combinada. Un oligo A y uno B se mezclaron como se indica en la tabla 3, se calentaron a 65°C durante 2 minutos y se enfriaron lentamente a < 35°C en 15 a 30 minutos. Los oligos recocidos A y B se alargaron como se indica en la tabla 3,4. Los componentes de la reacción de alargamiento se mezclaron justo antes de su uso. Después de mezclar, la reacción se dejó 5 minutos a RT para permitir el alargamiento de los oligonucleótidos recocidos. Los reactivos usados para el recocido (izquierda) y el alargamiento (derecha) de oligonucleótidos parcialmente complementarios se describen en la tabla 3. Los reactivos marcados en cursiva provienen del kit de secuenciación de ADN Sequenase Versión 2.0 (Affymetrix # 70770).
      - 55
      - 60

b. Modificación: Todas las etiquetas se diluyeron a concentraciones de trabajo (640 nM) en agua libre de nucleasas con Tween al 0,1%. Ahora, se trataron las etiquetas 2OS de secuencia de oligonucleótidos alargada como etiquetas 1OS.

5. Preparación de moléculas de MHC: Las moléculas de MHC (pMHC) y las etiquetas (oligonucleótidos) se unieron a la cadena principal (un conjugado de dextrano-estreptavidina-fluorocromo), para formar las moléculas de MHC, de tal manera que un pMHC determinado siempre se une a un oligonucleótido dado, manteniendo una relación de 1:1 entre un pMHC y un oligonucleótido.

a. Síntesis: Para la preparación de moléculas de MHC, la cadena principal se etiquetó en la forma de un oligo AxBx biotinilado antes de la adición de pMHC.

10 i. La creación de moléculas de MHC, si no se indica lo contrario, se realizó mediante la adición de la etiqueta en un exceso de dos veces sobre la cadena principal (2:1 etiqueta:cadena principal) y las moléculas se incubaron durante 30 min a 4°C. La unión de la etiqueta a la cadena principal (cadena principal) siempre se determinó después de la valoración cuando se usó un nuevo lote de cadena principal y/o etiquetas. Antes de acoplar las moléculas de MHC, los monómeros de pMHC, estos se centrifugaron durante 5 min, en 3300 g. El conjugado SA (cadena principal de Dextramer, Immudex) con estreptavidina conjugada (SA) y fluorocromo (PE) se dividieron en alícuotas en placas de 96 pocillos que coincidían con la configuración de reacción de intercambio de péptidos. Diferencias en el procedimiento para ensamblar PE. Para evitar el precipitado, se adicionaron moléculas de MHC al conjugado SA alícuotado y se incubaron durante 30 min a RT. Después de la formación del complejo, se adicionó D-biotina (Avidity Bio200) junto con NaN<sub>2</sub> al 0,02% en PBS, y se procedió a la incubación durante 30 min a 4°C. Las moléculas de MHC ensambladas se almacenaron hasta cuatro semanas a 4°C.

b. Modificación: Cuando el volumen total del panel combinado de moléculas de MHC excedió los 100 µl por incubación con muestra, el volumen se redujo.

25 i. Las columnas de centrifugación de exclusión por tamaño (Vivaspin 500, Sartorius) con un límite a 300 kDa se saturaron mediante la adición de 500 µl de BSA/PBS al 2% y la centrifugación de 5000 g, hasta que el volumen había pasado. Posteriormente, las columnas se lavaron dos veces adicionando 500 µl de PBS y centrifugando 5000 g hasta que no quedó un volumen considerable en las columnas. El panel combinado de moléculas de MHC se adicionó a la columna de centrifugación y se centrifugó en 5000 g, a 4°C, hasta que el volumen deseado residió en la columna (aproximadamente 80 µl por incubación con muestra).

30 c. Purificación: El panel de moléculas de MHC se movió a tubos Eppendorf y se centrifugó durante 5 min, en 5000 g, para sedimentar cualquier molécula de MHC que no estuviera en solución, antes de adicionarse a las células.

6. Incubación de la muestra y las moléculas de MHC: La muestra de células y las moléculas de MHC se mezclaron en un recipiente, a fin de permitir que las moléculas de MHC se unan a las células T que reconocen.

a. Cantidad de muestra: 2x10<sup>6</sup> células en forma de BC.

35 b. Cantidad de molécula de MHC

c. Condiciones: Todo el lavado de las células se refiere a la centrifugación durante 5 min, en 490 g, con la posterior eliminación del sobrenadante. Se transfirieron 2x10<sup>6</sup> células a pocillos individuales de placas de 96 pocillos, se lavaron en un tampón de código de barras (PBS/BSA al 0,5%/EDTA 2 mM/100 µg/ml de ADN de arenque) y se resuspendieron en este tampón a aproximadamente 20 µl por tinción. Al incubar la muestra con moléculas de MHC, las células se incubaron con dasatinib 50 nM durante 30 min a 37°C (Lissina y col. 2009). Las moléculas de MHC se centrifugaron durante 5 minutos, en 3300 g, antes de la adición a las células. Se requirieron 3 µL de cada molécula de MHC por incubación (1 µg/ml con respecto al pMHC) Después de adicionar las moléculas de MHC, las células se incubaron durante 15 min, a 37°C. La mezcla de anticuerpos enumerada en la tabla 2 se adicionó junto con 0,1 µl de tinte de viabilidad de IR cercano (Invitrogen L10119) que tinte las aminas libres. La tinción de anticuerpos fue esencialmente como la tinción de multímero de MHC convencional. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C, antes del lavado de cualquier molécula de MHC o anticuerpos que no se unían a las células. Las células se fijaron posteriormente adicionando 50 µL de paraformaldehído al 1%.

7. Enriquecimiento de moléculas de MHC con características deseadas: En este ejemplo, las moléculas de MHC se enriquecieron usando citometría de flujo, más específicamente, un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS). Las moléculas de MHC transportan un fluorocromo. Por tanto, las células que se unen a las moléculas de MHC fluorescerán, y pueden separarse de la célula que no se une a las moléculas de MHC y, por lo tanto, no fluoresce, mediante un clasificador FACS. Como resultado, las moléculas de MHC que se unen a las células se enriquecerán.

a. Aplicar: A lo largo de este estudio, se usaron dos citómetros de flujo diferentes para la adquisición. Un BD FACSCanto II equipado con tres láseres (de 488 nm azul, de 633 nm rojo y de 405 violeta) y un citómetro BD LSR II equipado con cinco láseres. Solo se usaron cuatro láseres en el LSR II a lo largo de este estudio (láser azul de 488 nm, láser rojo de 640 nm, láser UV de 355 nm y láser violeta de 405 nm). Adicionalmente, las células se clasificaron en BD FACSAria y FACSAria II, equipados con tres láseres (de 488 nm azul, de 633 nm rojo y de 405 violeta). Todos los análisis de datos de citometría de flujo se efectuaron usando el software BD FACSDiva versión 6.1.2.

60 i. Se usó la siguiente estrategia de activación. Todas las recolecciones iniciales de células CD8 positivas se efectuaron por igual. Los linfocitos se identificaron en una gráfico FSC/SSC. Se usaron compuertas adicionales en células individuales (FSC-A/FSC-H), células vivas (tinte negativo de viabilidad de IR cercano) y células



negativas de canal de descarga/CD8 positivas (FITC/PerCP) para definir la población de células T CD8.

b. Lavado: Las células se lavaron dos veces en un tampón de código de barras donde después las células estaban listas para la adquisición por citometría de flujo. Opcionalmente, las células se fijaron en paraformaldehído al 1%, 4°C, y se lavaron dos veces en un tampón de FACS o un tampón de código de barras. Las células fijadas se almacenaron durante un tiempo de hasta una semana a 4°C.

c. Separado: Opcionalmente, las células se adquirieron hasta una semana después de la fijación en paraformaldehído al 1%. Las células positivas para multímeros se clasificaron en tubos que se habían saturado previamente para 2h-ON en BSA al 2% y contenían 200 µl de tampón de código de barras para aumentar la estabilidad de los oligonucleótidos que siguieron con las células clasificadas. Las células positivas para multímeros clasificadas se centrifugaron durante 5 min, en 5000 g, a fin de permitir la eliminación de todo el exceso de tampón. Las células se almacenaron a -80°C.

i. Se trazaron puertas para definir los eventos positivos del fluorocromo conjugado único, es decir, PE o APC.

ii. La capacidad de los dextramers de pMHC se evaluó en función de la intensidad fluorescente media (MFI) o el índice de tinción (SI). El SI es una medida de la separación de la población, tomando en cuenta también los posibles efectos sobre la población negativa (fondo) y la propagación del fondo:

8. Identificación de la molécula de MHC enriquecida: Al identificar la etiqueta (en este ejemplo, la etiqueta del oligonucleótido), se pudieron identificar los pMHC que unían las células. Por lo tanto, se secuenciaron los oligonucleótidos que estaban comprendidos dentro de la molécula de MHC que se recuperaron con las células. Esto permitió la identificación de pMHC que unían las células de la muestra celular.

a. Las etiquetas derivadas de las células clasificadas se amplificaron por PCR antes de la secuenciación. Ver la tabla 4 para la composición de la PCR. La PCR se realizó con el kit: Kit de mezcla maestra Taq PCR (Qiagen, #201443). El perfil térmico se enumera en la tabla 5. La PCR se ejecutó en el termociclador: GeneAmp, PCR System 9700 (Applied Biosystem). Los productos de PCR se visualizaron después de la electroforesis en gel en un Bio-Rad Gel Doc EZ Imager.

i. El cebador directo e inverso incluía adaptadores para la reacción de secuenciación (clave A y clave P1 respectivamente, que son compatibles con la secuenciación Ion Torrent, Life Technologies).

ii. Además, el cebador directo llevaba un código de barras de identificación de muestra (tabla 8). Las etiquetas en las células clasificadas y sus moléculas de MHC asociadas derivadas de muestras individuales se amplificaron con cebadores que contenían una secuencia de identificación de muestra específica (tabla 8). Esto facilitó la distribución de las lecturas de secuencia derivadas de cada muestra individual. Además, a la entrada de paneles concentrados de moléculas MHC (antes de mezclarlas con las células) se les asignó un código de barras de identificación de muestra a través de PCR (denominado entrada de panel). La secuenciación de la entrada del panel permitiría la normalización de la salida de la secuencia analizada.

iii. Las lecturas de secuencia positivas se alinearon con las secuencias que se leen a partir de la identidad del código de barras de la muestra en el extremo 5' hasta la identidad del código de barras del pMHC. El número de lecturas se normalizó según el número total de lecturas asignadas a la misma identidad de código de barras de muestra y según las lecturas de entrada del panel. Etiqueta de desconvolución en la molécula de MHC

b. La secuenciación de las etiquetas de oligonucleótidos de ADN se efectuó a cabo en un chip 314 Ion Torrent (GeneDx). Los adaptadores se introdujeron mediante cebadores durante la PCR (consulte la tabla 8 para ver las secuencias del adaptador)

i. Se creó una base de datos de secuencia que consta de las posibles combinaciones de 15 códigos de barras de identificación de muestra y 358 códigos de barras de pMHC (118 1OS + 240 2OS), junto con las secuencias de cebado y recido de los sistemas 1OS y 2OS. Esto acumuló 5370 secuencias que podrían esperarse de una ejecución de secuenciación. Luego, cada lectura de secuenciación se usó para buscar alineaciones en la base de datos, usando el algoritmo BLAST de nucleótidos, con una recompensa de coincidencia de 1, una recompensa de falta de coincidencia de -2 y un costo de diferencia de 2 para abrir y extender una diferencia. De esta manera, los errores de secuenciación se penalizaron por igual, ya sea que una base fuera mal llamada o insertada/eliminada en la lectura de secuenciación en comparación con la secuencia real.

ii. Las alineaciones se descartaron según los siguientes criterios:

1. Valor  $E > 1e-12$ ; longitud de alineación insuficiente (debe ser mayor que 60 o 102 bases para los sistemas 1OS y 2OS, respectivamente)

2. Posición inicial en la secuencia del sujeto mayor a 2, es decir que, en la alineación, se incluyeron menos de 5 de entre 6 bases en la parte única del código de barras de identificación.

3. Si incluso era posible encontrar varias alineaciones para cualquier lectura de secuencia, solo se mantuvo la alineación con el mejor porcentaje de identidad. Finalmente, se contó el número de lecturas asignadas a cada código de barras en la base de datos.

iii. Identificación de códigos de barras sobrerrepresentados: Los recuentos de lectura relativos se calcularon normalizando cada lectura a la asignación del recuento de lectura total para el mismo código de barras de identidad de muestra. Los recuentos de lectura relativos se usaron para calcular el cambio múltiplo por código de barras en comparación con la entrada de código de barras de muestra de control (panel de moléculas de detección con código de barras que no se mezcló con las células). Se identificaron códigos de barras significativamente sobrerrepresentados usando una prueba de 2 muestras para la igualdad de proporciones en

los recuentos de lectura sin procesar en una muestra versus la entrada de código de barras de control, y los valores p se corrigieron para múltiples pruebas usando el método FDR de Benjamini-Hochberg.

**Resultado del ejemplo 5:**

5 Este ejemplo muestra la viabilidad para la detección de células T sensibles a antígenos en una gran mezcla de diferentes multímeros de pMHC (moléculas de MHC). Mostramos la sensibilidad de los multímeros de MHC etiquetados con código de barras que son capaces de detectar al menos el 0,00032% de células T específicas de las células T CD8. Encontramos una correlación exacta con los procedimientos descritos anteriormente (bajo  
10 rendimiento).

Figura 9. Presentaciones esquemáticas del número de lecturas de códigos de barras 1OS específicas asignadas a siete muestras diferentes. Una respuesta B7 CMV pp65 TPR del 5% (código de barras 88) se adicionó a un BC negativo para HLA-B7 en diluciones de cinco veces, creando siete muestras (del 5, el 1, el 0,2, el 0,04, el 0,008, el  
15 0,0016 y el 0,00032%). Este BC presenta una población de células T específicas A11 EBV-EBNA4 (correspondiente al código de barras 4). Las muestras se tiñeron con el mismo panel que comprendía 110 dextramers de pMHC con código de barras 1OS diferentes. Las barras muestran las lecturas totales normalizadas al panel de entrada en cada muestra. Los experimentos se efectuaron a cabo por duplicado. Aquí se muestra la media.

20 Figura 10. Presentaciones esquemáticas del número de lecturas de códigos de barras 2OS específicas asignadas a siete muestras diferentes. Una respuesta B7 CMV pp65 TPR del 5% (código de barras A3B18) se adicionó a un BC negativo para HLA-B7 en diluciones de cinco veces, creando siete muestras (del 5, el 1, el 0,2, el 0,04, el 0,008, el 0,0016 y el 0,00032%). Este BC presenta una población de células T específicas A11 EBV-EBNA4 (correspondiente al código de barras A1B4). Las muestras se tiñeron con el mismo panel que comprendía 110 dextramers de pMHC  
25 con código de barras 2OS diferentes. Las barras muestran las lecturas totales normalizadas al panel de entrada en cada muestra. Los experimentos se efectuaron a cabo por duplicado. Aquí se muestra la media.

**Ejemplo 6:**

30 El ejemplo 6 se realizan exactamente como el ejemplo 5, con la única diferencia de que hemos usado una muestra diferente. Aquí detectamos células T sensibles a antígenos en 5 muestras de sangre de donantes diferentes.

**Resultados del ejemplo 6:**

35 Este ejemplo muestra la viabilidad de detectar numerosas especificidades diferentes en diferentes muestras de donantes usando multímeros de MHC etiquetados con un código de barras de ADN. Los datos obtenidos muestran la viabilidad de la detección de alto rendimiento de la reactividad de las células T en numerosos donantes para evaluar la reactividad inmune asociada al desarrollo de la enfermedad, la vacunación, la infección, etc.

40 Figura 11. Presentaciones esquemáticas del número de lecturas de códigos de barras 1OS específicas asignadas a seis muestras diferentes. Seis BC se tiñeron con el mismo panel que comprendía 110 dextramers de pMHC con código de barras 1OS diferentes. Los gráficos de barras muestran las lecturas totales normalizadas al panel de entrada en cada muestra ( $p < 0,05$ ). Cada gráfico circular muestra lecturas significativas ( $p < 0,01$ ) asignadas a esa muestra.

45 Figura 12. Presentaciones esquemáticas del número de lecturas de códigos de barras 2OS específicas asignadas a seis muestras diferentes. Seis BC se tiñeron con el mismo panel que comprendía 110 dextramers de pMHC con código de barras 2OS diferentes. Los gráficos de barras muestran las lecturas totales normalizadas al panel de entrada en cada muestra ( $p < 0,05$ ).

**50 Tablas:**

Tabla 1: Una lista de reactivos necesarios para la producción de multímeros pMHC producidos a partir de una reacción de intercambio de 100 µg/ml. También se especifican las cantidades de los reactivos respectivos usados para teñir células de  $1 \times 10^6$ - $2 \times 10^6$  en 100 µl.

55

	Conjugado SA/intercambio de µl	D-Biotina	Extremo: TET de pMHC	Cantidad por tinción
<b>SA</b>	0,092 µl (0,1 µg/ml)	28 µM	100 µg/ml	1 µl
<b>PE</b>	1,32 µl	12,6 µM	44 µg/ml	3 µl
<b>APC</b>	0,73 µl	9,78 µM	24,25 µg/ml	3 µl

**Tabla 2:** Una lista de los componentes en la mezcla de anticuerpos adicionados después de la incubación con moléculas de MHC o después de la tinción con multímeros de MHC convencionales.

Objetivo	Conjugado	Cantidad (µl)	Fuente
CD8	PerCP	2	Invitrogen MHCD0831
CD4	FITC	1,25	BD bioscience 345768
CD14	FITC	3,13	BD bioscience 345784
CD16	FITC	6,25	BD bioscience 335035
CD19	FITC	2,50	BD bioscience 345776
CD40	FITC	1,56	Serotec MCA1590F

5

**Tabla 3:** Los reactivos usados para el recocido (izquierda) y el alargamiento (derecha) de oligonucleótidos parcialmente complementarios. Los reactivos marcados en cursiva provienen del kit de secuenciación de ADN Sequenase Versión 2.0 (Affymetrix # 70770).

Reacción de recocido	(10 µl)	Reacción de alargamiento	(15,5 µl)
Oligo A (100 µM)	2,6 µl	Reacción de recocido	10 µl
Oligo B (100 µM)	5,4 µl	0,1 M DTT	1 µl
<i>Tampón de reacción Sequenase</i>	2 µl	H <sub>2</sub> O	0,5 µl
		8x diluido <i>Polimerasa de Sequenase</i>	2 µl
		5x diluido <i>Mezcla de extensión de la secuencia</i>	2 µl

10

**Tabla 4:** La mezcla maestra de PCR se aplicó antes de la secuenciación de etiquetas en moléculas de MHC asociadas a células clasificadas. El cebador directo e inverso incluía adaptadores para la reacción de secuenciación (clave A y clave P1 respectivamente). Además, el cebador directo llevaba una secuencia de identificación de muestra (tabla 8).

15

Componente	Volumen por muestra (µl)
Mezcla maestra	25
Cebador directo (5 µM)	3
Cebador inverso (5 µM)	3
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	9
Plantilla	10

**Tabla 5:** El perfil térmico aplicado para la amplificación de etiquetas en moléculas de MHC asociadas a células clasificadas. Si se clasificaban > 1.000 células, se aplicaban 36 ciclos; mientras que, si se clasificaban < 1.000 células, se aplicaban 38 ciclos.

20

Temperatura (°C)	Tiempo	No. de ciclos	
-	95	10 min	1
-	95	30 s	
-	60	45 s	36-38

Temperatura (°C)		Tiempo	No. de ciclos
-	72	30 s	
-	72	4 min	1
-	4	∞	

5 **Tabla 6.** BC incluidos en los experimentos 3 a 6. Especificidades de virus detectadas por codificación combinatoria de multímeros de MHC convencionales con 25 péptidos de virus. La frecuencia de cada respuesta se enumera junto con los números de etiqueta 1OS y 2OS designados en el experimento.

	Epitopo	Frec. (%)	1OS	2OS
<b>BC261</b>	A2 FLU MP 58-66 GIL	0,1249	24	A3B4
	A3 EBV EBNA 3a RLR	0,0258	60	A6B10
	A2 EBV LMP2 FLY	0,0075	27	A3B7
<b>BC266</b>	A1 CMV pp65 YSE	0,0859	1	A1B1
	A1 FLU BP-VSD	0,0628	3	A1B3
<b>BC171</b>	A11 EBV-EBNA4	0,3	4	A1B4
	A3 CMV pp150 TVY	0,015	61	A1B11
<b>BC254</b>	A2 FLU MP 58-66 GIL	0,0522	24	A3B4
	A2 EBV LMP2 FLY	0,014	27	A3B7
	A2 CMV pp65 NLV	1,1279	28	A3B8
<b>BC268</b>	A2 FLU MP 58-66 GIL	0,2523	24	A3B4
	A2 CMV pp65 NLV	05445	28	A3B8
<b>BC260</b>	A2 FLU MP 58-66 GIL	0,0456	24	A3B4
	A2 CMV pp65 NLV	0,134	28	A3B8
	B7 CMV pp65 TPR	4,5395	88	A3B18

10 **Tabla 7:** Oligos de prueba con diferentes modificaciones de extremo

'b' = Modificación de biotina-TEG 5'	
'h' = HEG (modificaciones de terminal)	
Directo-01	GAGATACGTTGACCTCGTTG
Inverso-01	ATGCAACCAAGAGCTTAAGT
Inverso-03	hATGCAACCAAGAGCTTAAGT
Oligo de prueba-01	
bGAGATACGTTGACCTCGTTGAANNNNNTCTATCCATTCCATCCAGCTCACTTAAGC TCTTGGTTGCAT	
Oligo de prueba-02	
bhGAGATACGTTGACCTCGTTGAANNNNNTCTATCCATTCCATCCAGCTCACTTAAG CTCTTGGTTGCAT	

ES 2 770 634 T3

Oligo de prueba-03		
bhGAGATACGTTGACCTCGTTGAANNNNNNNTCTATCCATTCCATCCAGCTCACTTAAG CTCTTGGTTGCATh		
Oligo de prueba-04		
bhGAGATACGTTGACCTCGTTGAANNNNNNNTCTTGAACTATGAATCGTCTCACTTAAG CTCTTGGTTGCATh		
Oligo de prueba-05		
bhGAGATACGTTGACCTCGTTGAANNNNNNNTCTATAGGTGTCTACTACCTCACTTAAG CTCTTGGTTGCATh		
Oligo de prueba-06		
bhGAGATACGTTGACCTCGTTGAANNNNNNNTCTTTATTGGAGAGCACGCTCACTTAAG CTCTTGGTTGCATh		
Sonda-03 Tm 64,9	8TCTATCCATTCCATCCAGCTC7	8 = FAM; 7 = BHQ-1-plus
Sonda-04 Tm 57,3	8TCTTGAACTATGAATCGTCTC7	8 = FAM; 7 = BHQ-1-plus
Sonda-05 Tm 58,5	9TCTATAGGTGTCTACTACCTC7	9 = HEX; 7 = BHQ-1-plus
Sonda-06 Tm 60,9	2TCTTTATTGGAGAGCACGCTC1	2 = Cy5; 1= BHQ-2-plus
LNA-3 TCTATCCATTCCATCCAGC		8 = FAM; 7 = BHQ-1-plus
LNA-4 TCT[+T][+G][+A]AC[+T][+A]TG[+A][+A][+T]CGTC		8 = FAM; 7 = BHQ-1-plus
LNA-5 TCT[+A][+T][+A]GG[+T][+G]TC[+T][+A][+C]TACC		9 = HEX; 7 = BHQ-1-plus
LNA-6 TCT[+T][+T][+A]TT[+G][+G]AG[+A][+G][+C]ACGC		2 = Cy5; 1 = BHQ-2-plus

ES 2 770 634 T3

Tabla 8: La clave A mantienen el código de barras de identificación de la muestra y la clave para la secuenciación Ion Torrent. La clave P1 solo mantiene la secuenciación Ion Torrent.

Clave A 10S-F1-1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGAAGATGATTCTATAAACTGTGCGGTCC
Clave A 10S-F1-2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCTGAGATTCTATAAACTGTGCGGTCC
Clave A 10S-F1-3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGTGGAGATTCTATAAACTGTGCGGTCC
Clave A 10S-F1-4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCATTAGATTCTATAAACTGTGCGGTCC
Clave A 10S-F1-5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTACCGATTCTATAAACTGTGCGGTCC
Clave A 10S-F1-6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATTCTCGATTCTATAAACTGTGCGGTCC
Clave A 10S-F1-7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGACCCGATTCTATAAACTGTGCGGTCC
Clave A 10S-F1-8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGCATGGATTCTATAAACTGTGCGGTCC
Clave A 10S-F1-9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCTCGGATTCTATAAACTGTGCGGTCC
Clave A 10S-F1-10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATTCTGATTCTATAAACTGTGCGGTCC
Clave A 10S-F1-11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGTCGAGATTCTATAAACTGTGCGGTCC
Clave A 10S-F1-12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGCCAATGATTCTATAAACTGTGCGGTCC
Clave A 10S-F1-13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATACGGGATTCTATAAACTGTGCGGTCC
Clave A 10S-F1-14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGTCAGAGATTCTATAAACTGTGCGGTCC
Clave A 10S-F1-15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGOGAGTTGATTCTATAAACTGTGCGGTCC
Clave A 20S-F1-1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGGGGGAAGTCCAGCCAGCGTC
Clave A 20S-F1-2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTCCACGAAGTCCAGCCAGCGTC
Clave A 20S-F1-3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTTACCGAAGTCCAGCCAGCGTC
Clave A 20S-F1-4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGGCAGGAAGTCCAGCCAGCGTC
Clave A 20S-F1-5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGTAGAAGTCCAGCCAGCGTC
Clave A 20S-F1-6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATTCAGGAAGTCCAGCCAGCGTC
Clave A 20S-F1-7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGCTGAAGTCCAGCCAGCGTC
Clave A 20S-F1-8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGGCGTGAAGTCCAGCCAGCGTC
Clave A 20S-F1-9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAATTGGAAGTCCAGCCAGCGTC
Clave A 20S-F1-10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGCTGACGAAGTCCAGCCAGCGTC
Clave A 20S-F1-11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCTTAGAAGTCCAGCCAGCGTC
Clave A 20S-F1-12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGGTGGGAAGTCCAGCCAGCGTC
Clave A 20S-F1-13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGCAGTGAAGTCCAGCCAGCGTC
Clave A 20S-F1-14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGTGAGAAGTCCAGCCAGCGTC
Clave A 20S-F1-15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACAGTGAAGTCCAGCCAGCGTC
Clave P1 10S-R1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGAGTACATGATAGCGCGTAC
Clave P1 20S-R1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTGTGACTATGTGAGGCTTTC

Tabla 9: Los oligos representativos se aplicaron en la biblioteca de 110 miembros de moléculas de MHC (ejemplos 3 a 6)

5

10S			
Nombre de oligo	Modificación del 5'	Región del cebador directo	Región 6xN
10S-1-Oligo-1	Biotina-C6-	AGATTCTATAAACTGTGCGGTCTT	NNNNNN
10S-1-Oligo-2	Biotina-C6-	AGATTCTATAAACTGTGCGGTCTT	NNNNNN
10S-1-Oligo-3	Biotina-C6-	AGATTCTATAAACTGTGCGGTCTT	NNNNNN
10S-1-Oligo-4	Biotina-C6-	AGATTCTATAAACTGTGCGGTCTT	NNNNNN

ES 2 770 634 T3

<b>10S</b>			
<b>Nombre de oligo</b>	<b>Modificación del 5'</b>	<b>Región del cebador directo</b>	<b>Región 6xN</b>
10S-1-Oligo-5	Biotina-C6-	AGATTCTATAAACTGTGCGGTCCTT	NNNNNN
10S-1-Oligo-6	Biotina-C6-	AGATTCTATAAACTGTGCGGTCCTT	NNNNNN
10S-1-Oligo-7	Biotina-C6-	AGATTCTATAAACTGTGCGGTCCTT	NNNNNN
10S-1-Oligo-8	Biotina-C6-	AGATTCTATAAACTGTGCGGTCCTT	NNNNNN
10S-1-Oligo-9	Biotina-C6-	AGATTCTATAAACTGTGCGGTCCTT	NNNNNN
10S-1-Oligo-10	Biotina-C6-	AGATTCTATAAACTGTGCGGTCCTT	NNNNNN
<b>Región de codificación</b>		<b>Región del cebador inverso</b>	
TATGAGGACGAATCTCCCGCTTATA		GGTACGGCGCTATCATGTACTCATG	
GGTCTTGACAAACGTGTGCTTGTAC		GGTACGGCGCTATCATGTACTCATG	
GTTTATCGGGCGTGGTGCTCGCATA		GGTACGGCGCTATCATGTACTCATG	
CCGATGTTGACGGACTAATCCTGAC		GGTACGGCGCTATCATGTACTCATG	
TAGTAGTTCAGACGCCGTTAAGCGC		GGTACGGCGCTATCATGTACTCATG	
CCGTACCTAGATACACTCAATTTGT		GGTACGGCGCTATCATGTACTCATG	
GGGGTTCCGTTTTATTCCAGGAA		GGTACGGCGCTATCATGTACTCATG	
TATCCCGTGAAGCTTGAGTGAATC		GGTACGGCGCTATCATGTACTCATG	
GGTATGGCACGCCTAATCTGGACAC		GGTACGGCGCTATCATGTACTCATG	
<b>20S-A</b>			
<b>Nombre de oligo</b>	<b>Modificación del 5'</b>	<b>Región del cebador directo</b>	<b>Región 6xN</b>
20S-1-Oligo-A1	Biotina-C6-	GAAGTTCAGCCAGCGTCACAGTTT	NNNNNN
20S-1-Oligo-A2	Biotina-C6-	GAAGTTCAGCCAGCGTCACAGTTT	NNNNNN
20S-1-Oligo-A3	Biotina-C6-	GAAGTTCAGCCAGCGTCACAGTTT	NNNNNN
20S-1-Oligo-A4	Biotina-C6-	GAAGTTCAGCCAGCGTCACAGTTT	NNNNNN
20S-1-Oligo-A5	Biotina-C6-	GAAGTTCAGCCAGCGTCACAGTTT	NNNNNN
20S-1-Oligo-A6	Biotina-C6-	GAAGTTCAGCCAGCGTCACAGTTT	NNNNNN
<b>Región de codificación</b>		<b>Región de recodo</b>	
CGAGGGCAATGGTAACTGACACGT		GGTCAGCATCATTTC	
CAGAAAGCAGTCTCGTCCGTTTCGAA		GGTCAGCATCATTTC	
TAAGTAGCGGGCATAATGTACGCTC		GGTCAGCATCATTTC	
GGATCCAGTAAGCTACTGCGTTTAT		GGTCAGCATCATTTC	
GGGCTGCGGAGCGTTTACTCTGTAT		GGTCAGCATCATTTC	
AAACGTATGTGCTTTGTCCGATGCC		GGTCAGCATCATTTC	

ES 2 770 634 T3

<b>2OS-B</b>			
<b>Nombre de oligo</b>	<b>Modificación del 5'</b>	<b>Región del cebador directo (2OS-R)</b>	<b>Región 6xN</b>
2OS-1-Oligo-B1		CTGTGACTATGTGAGGCTTTCTCGA	NNNNNN
2OS-1-Oligo-B2		CTGTGACTATGTGAGGCTTTCTCGA	NNNNNN
2OS-1-Oligo-B3		CTGTGACTATGTGAGGCTTTCTCGA	NNNNNN
2OS-1-Oligo-B4		CTGTGACTATGTGAGGCTTTCTCGA	NNNNNN
2OS-1-Oligo-B5		CTGTGACTATGTGAGGCTTTCTCGA	NNNNNN
2OS-1-Oligo-B6		CTGTGACTATGTGAGGCTTTCTCGA	NNNNNN
2OS-1-Oligo-B7		CTGTGACTATGTGAGGCTTTCTCGA	NNNNNN
2OS-1-Oligo-B8		CTGTGACTATGTGAGGCTTTCTCGA	NNNNNN
2OS-1-Oligo-B9		CTGTGACTATGTGAGGCTTTCTCGA	NNNNNN
2OS-1-Oligo-B10		CTGTGACTATGTGAGGCTTTCTCGA	NNNNNN
<b>Región de codificación</b>		<b>Región de recocido</b>	
GCCTGTAGTCCCACGCGATCTAACA		GGAAATGATGCTGACC	
CAACCATTGATTGGGGACAACCTGGG		GGAAATGATGCTGACC	
ACGTTTAAGCATCTGTA CTCCAGAT		GGAAATGATGCTGACC	
GAATTGAAGCCATCGTTTCGCGCAA		GGAAATGATGCTGACC	
CGTAGCTTTTGTAGCGTCTGAGGGC		GGAAATGATGCTGACC	
AATCGTCAGTCCCTGTTTCGACATC		GGAAATGATGCTGACC	
CGGTGGTAGGTGATACTTCTGTACC		GGAAATGATGCTGACC	
TGA CTATCGGGGCGTGACATGAGCT		GGAAATGATGCTGACC	
GTTGGTGAAACTACCGACGCTTTAC		GGAAATGATGCTGACC	
AATGGAGGTGCAGGAATACTCTCGT		GGAAATGATGCTGACC	



ES 2 770 634 T3

Tabla 10: Lista de etiquetas y moléculas de pMHC en bibliotecas de 110 miembros (ejemplos 3 a 6)

N.º de código de barras de 10S	N.º de código de barras de 20S	HLA	Pérido	Secuencia
1	A1B1	A1	CMV pp65 YSE	YSEHPTFTSQY
2	A1B2	A1	CMV pp50 VTE	VTEHDTLLY
3	A1B3	A1	FLU BP-VSD	VSDGGPNLY
4	A1B4	A11	EBV-EBNA4	AVFDRKSDAK
5	A1B5	A11	HCMV pp65	GPISGHVVK
6	A1B6	A11	VP1	DLQGLVLDY
7	A1B7	A11	VP1	VLGRKMTPK
8	A1B8	A11	VP1	VTLRKRWVK
9	A1B9	A11	VP1	LVL DYQTEY
10	A1B10	A11	VP1	GQEKTVYPK
11	A2B1	A11	VP1	VTFQSNQQDK
12	A2B2	A11	VP1	LKGPQKASQK
13	A2B3	A11	VP1	NVASVPKLLVK
14	A2B4	A11	VP1	TSNWYTYTY
15	A2B5	A11	VP1	LVL DYQTEYPK
16	A2B6	A11	VP1	TLRKRWVKNPY
17	A2B7	A11	VP1	AVTFQSNQQDK
18	A2B8	A11	VP1	PLKGPQKASQK
19	A2B9	A2	VP1	RIYEGSEQL
20	A2B10	A11	VP1	SLFSNLMPK
21	A3B1	A2	VP1	KLLVKGGVEV
22	A3B2	A11	VP1	SLINVHYWDMK
23	A3B3	A2	HPV E6 29-38	TIHDIILECV
24	A3B4	A2	FLU MP 58-66 GIL	GILGFVFTL
25	A3B5	A2	EBV LMP2 CLG	CLGGLLTMV
26	A3B6	A2	EBV BMF1 GLC	GLCTLVAML
27	A3B7	A2	EBV LMP2 FLY	FLYALALL
28	A3B8	A2	CMV pp65 NLV	NLVPMVATV
29	A3B9	A2	EBV BRLF1 YVL	YVL DHLIVV
30	A3B10	A2	HPV E7 11-20	YMLDLQPETT
31	A4B1	A2	CMV IE1 VLE	VLEETSVMML
32	A4B2	A2	VP1	GCCPNVASV
33	A4B3	A2	VP1	SITQIELYL
34	A4B4	A2	VP1	LQMWEAISV
35	A4B5	A2	VP1	AISVKTEVV
36	A4B6	A2	VP1	KMTPKNQGL
37	A4B7	A2	VP1	TVLQFSNTL

ES 2 770 634 T3

38	A4B8	A2	VP1	GLFISCADI
39	A4B9	A2	VP1	LLVKGGVEVL
40	A4B10	A2	VP1	ELYLNPRMGV
41	A5B1	A2	VP1	NLPAYSVARV
42	A5B2	A2	VP1	TLQMWEAISV
43	A5B3	A2	VP1	QMWEAISVKT
44	A5B4	A2	VP1	VVGISSLINV
45	A5B5	A2	VP1	SLINVHYWDM
46	A5B6	A2	VP1	HMFAIGGEPL
47	A5B7	A2	VP1	FAIGGEPLDL
48	A5B8	A2	VP1	NLINSLFSNL
49	A5B9	A2	VP1	FLFKTSGKMAL
50	A5B10	A2	VP1	ALHGLPRYFNV
51	A6B1	A2	VP1	NLINSLFSNLM
52	A6B2	A2	VP1	FLDKFGQEKTV
53	A6B3	A2	VP1	VKGGVEVLSV
54	A6B4	A24	HCMV 248-256	A Y A Q K I F K I L
55	A6B5	A24	EBV LMP2	IYVLVMLVL
56	A6B6	A24	EBV BRLF1	TYPVLEEMF
57	A6B7	A24	EBV BMLF1	DYNFVKQLF
58	A6B8	A3	CMV pp150 TTV	TTVYPPSSTAK
59	A6B9	A3	FLU NP 265-273 ILR	ILRGSVAHK
60	A6B10	A3	EBV EBNA 3a RLR	RLRAEAQVK
61	A1B11	A3	CMV pp150 TVY	TVYPPSSTAK
62	A1B12	A3	EBV BRLF1 148-56 RVR	RVRAYTYSK
63	A1B13	A3	VP1	ASVPKLLVK
64	A1B14	A3	VP1	CCPNVASVPK
65	A1B15	A3	VP1	ITIETVLGR
66	A1B16	A3	VP1	NLTTVLLD
67	A1B17	A3	VP1	ALHGLPRYF
68	A1B18	A3	VP1	VASVPKLLVK
69	A1B19	A3	VP1	VSGQPMEGK
70	A1B20	A3	VP1	KASSTCKTPK
71	A2B11	A3	VP1	KTPKRQCIPK
72	A2B12	A3	VP1	YTYTYDLQPK
73	A2B13	A3	VP1	PITIETVLGR
74	A2B14	B7	VP1	SVARVSLPM
75	A2B15	A3	VP1	NSLFSNLMPK
76	A2B16	A3	VP1	KVSGQPMEGK
77	A2B17	A3	VP1	TVYPKPSVAP
78	A2B18	A3	VP1	SLINVHYWDMK
79	A2B19	A3	VP1	GVEVLSVVT
80	A2B20	A3	VP1	PLDLQGLVL
81	A3B11	A3	VP1	GLDPQAKAK
82	A3B12	A3	VP1	EVWCPDPSK
83	A3B13	A3	VP1	ADIVGFLFK

84	A3B14	A3	VP1	KTSGKMALH
85	A3B15	A3	VP1	KMALHGLPR
86	A3B16	A3	VP1	RYFNVTLRK
87	A3B17	A3	VP1	TLRKRWVKN
88	A3B18	B7	CMV pp65 TPR	TPRVTGGGAM
89	A3B19	B7	CMV pp65 RPH-L	RIPHERNGFTV
90	A3B20	B7	EBV EBNA RPP	RPPIFIRLL
91	A4B11	B7	VP1	KPGCCPNVA
92	A4B12	B7	VP1	QPIKENLPA
93	A4B13	B7	VP1	LPRYFNVTL
94	A4B14	B7	VP1	MPKVSGQPM
95	A4B15	B7	VP1	YPKPSVAPA
96	A4B16	B7	VP1	KPSVAPAAV
97	A4B17	B7	VP1	APLKG PQKA
98	A4B18	B7	VP1	APKRKASSTC
99	A4B19	B7	VP1	SVARVSLPML
100	A4B20	B7	VP1	YPKTTNGGPI
101	A5B11	B7	VP1	YPKPSVAPAA
102	A5B12	B7	VP1	KPGCCPNVASV
103	A5B13	B7	VP1	NPRMGVNSPDL
104	A5B14	B7	VP1	LPAYSVARVSL
105	A5B15	B7	VP1	TPTVLQFSNTL
106	A5B16	B7	VP1	LPRYFNVTLRK
107	A5B17	B7	VP1	YPVVNLINSLF
108	A5B18	B7	VP1	YPKPSVAPAAV
109	A5B19	B7	VP1	KPSVAPAAVTF
110	A5B20	B7	VP1	APKRKASST

Tabla 11: Número de células clasificadas en los ejemplos 3 a 6, usando la biblioteca de 110 miembros **Seis BC**

<b>1OS</b>	<b>Células CD8</b>	<b>Células clasificadas</b>	<b>Fracción (%)</b>
BC171	55036	3737	6,790101025
BC254	228535	3369	1,474172446
BC261	49227	792	1,608873179
BC266	27769	1237	4,454607656
BC268	120307	2490	2,069705005
<b>2OS</b>	<b>Células CD8</b>	<b>Células clasificadas</b>	<b>Fracción (%)</b>
BC171	80851	4681	5,789662466
BC254	175729	2663	1,515401556

1OS	Células CD8	Células clasificadas	Fracción (%)
BC261	57926	816	1,408693851
BC266	46916	2077	4,427061131
BC268	250144	4157	1,661842779

Tabla 12:

<u>Abreviaturas</u>
1OS Sistema de oligo único
2OS Sistema de dos oligos
AIRE Regulador autoinmune
APC Aloficocianina
Secuencia de oligonucleótidos de código de barras
BC Capa leucocitaria
Células B Linfocitos B
BSA Albúmina de suero bovino
CD Clúster de diferenciación
CDR Regiones determinantes complementarias
CMV Citomegalovirus
Ct Umbral cruzado
CTL Linfocito T citotóxico
CyTOF Citometría por tiempo de vuelo
DC Células dendríticas
DMSO Dimetilsulfóxido
dT Cadena principal de timidina
EBV Virus Epstein-Barr
EDTA ácido etilendiaminotetraacético
ELISPOT Inmunospot ligado a enzimas
ER Retículo endoplasmático
FACS Clasificación celular activada por fluorescencia
FBS Suero bovino fetal
FCS Suero de ternera fetal
FITC Isotiocianato de fluoresceína
HEG Hexaetilenglicol
VIH Virus de la inmunodeficiencia humana
HLA Antígeno leucocitario humano
HPLC Cromatografía líquida de alto rendimiento
IFN Interferón
Ii Cadena invariante

<u>Abreviaturas</u>
IL Interleucina
MHC Complejo mayor de histocompatibilidad
N6 Seis nucleótidos aleatorios
NIR Infrarrojo cercano
nt Nucleótido
O.N. Durante la noche
PBMC Células mononucleares de sangre periférica
PBS Solución salina tamponada con fosfato
PCR Reacción en cadena de la polimerasa v
PE R-ficoeritrina
PerCP Clorofila de peridina
p* Péptido condicional a UV
PBS Solución salina tamponada con fosfato
pMHC Péptido-complejo mayor de histocompatibilidad
PCR Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR Reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa
RAG1/RAG2 Genes activadores recombinantes
RT Temperatura ambiente
SA Estreptavidina
SI Índice de manchas
TAP1/TAP2 Transportador asociado al procesamiento de antígenos
Células T Linfocitos T
TCR Receptor de células T
TEG Trietilenglicol
TET Tetrámeros
Th Células T auxiliares
TIL Linfocito infiltrante tumoral
Tm Temperatura de fusión
TNF Factor de necrosis tumoral
Treg Células regulatorias T vi vii

### **Bibliografía**

- 5 1. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, y col. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*. 1996;274:94-6.
2. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 1988;334:395-402.
- 10 3. Robins HS, Campregher P V, Srivastava SK, Wachter A, Turtle CJ, Kahsai O, y col. Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells. *Blood*. 2009;114:4099-107.
4. Hadrup SR, Bakker AH, Shu CJ, Andersen RS, van VJ, Hombrink P, y col. Parallel detection of antigen-specific T-

cell responses by multidimensional encoding of MHC multimers. *Nature Methods*. 2009;6:520-6.

5. Andersen RS, Kvistborg P, Mørch TF, Pedersen NW, Lyngaa R, Bakker AH, y col. Parallel detection of antigen-specific T-cell responses by combinatorial encoding of MHC multimers. *NatProtoc*. 2012

5

6. Newell EW, Sigal N, Nair N, Kidd B a, Greenberg HB, Davis MM. Combinatorial tetramer staining and mass cytometry analysis facilitate T-cell epitope mapping and characterization. *Nat Biotechnol*. 2013;1-9.

7. Soen Y, Chen DS, Kraft DL, Davis MM, Brown PO. Detection and characterization of cellular immune responses using peptide-MHC microarrays. *PLoS Biol*. 2003;1:429-38.

10

8. Stone JD, Demkowicz Jr. WE, Stern LJ. HLA-restricted epitope identification and detection of functional T cell responses by using MHC-peptide and costimulatory microarrays. *ProcNatlAcadSciUSA*. 2005;102:3744-9.

15 9. Newell EW, Davis MM. Beyond model antigens: high-dimensional methods for the analysis of antigen-specific T cells. *Nat Biotechnol*. 2014;32.

10. Dössinger G, Bunse M, Bet J, Albrecht J, Paszkiewicz PJ, Weißbrich B, y col. MHC multimer-guided and cell culture-independent isolation of functional T cell receptors from single cells facilitates TCR identification for immunotherapy. *PLoS One*. 2013;8:e61384.

20

11. Cha E, Klinger M, Hou Y, Cummings C, Ribas A, Faham M, y col. Improved Survival with T Cell Clonotype Stability After Anti-CTLA-4 Treatment in Cancer Patients. *Sci Transl Med*. 2014;6:238ra70.

25 12. Robert L, Tsoi J, Wang X, Emerson RO, Homet B, Chodon T, y col. CTLA4 blockade broadens the peripheral T cell receptor repertoire. *Clin Cancer Res*. 2014

13. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, y col. Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science*. 2006.

30

14. Pannetier C, Even J, Kourilsky P. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *ImmunolToday*. 1995;16:176-81.

15. Cameron BJ, Gerry AB, Dukes J, Harper J V, Kannan V, Bianchi FC, y col. Identification of a Titin-derived HLA-A1-presented peptide as a cross-reactive target for engineered MAGE A3-directed T cells. *Sci Transl Med*. 2013;5:197ra103.

35

16. Linette GP, Stadtmauer E a, Maus M V, Rapoport AP, Levine BL, Emery L, y col. Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood*. 2013;122:863-71.

40

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende un conjunto de diferentes subconjuntos de complejos mayores de histocompatibilidad multiméricos (MHC multiméricos),
- 5 en la que cada subconjunto de MHC multimérico comprende i) dos o más moléculas de MHC unidas a una molécula principal, y ii) al menos una molécula de ácido nucleico unida a dicha cadena principal, dicha al menos una molécula de ácido nucleico que comprende una primera región de cebador 5', una región central (región del código de barras) y una segunda región de cebador 3', en la que dicho código de barras sirve como una etiqueta específica para una molécula péptido-MHC dada,
- 10 en la que cada subconjunto de MHC multimérico presenta un péptido diferente decisivo para el reconocimiento de células T y una molécula de ácido nucleico única asociada que comprende una región de código de barras, en la que cada código de barras en cada subconjunto de MHC multimérico presenta extremos de amplificación compartidos, permitiendo la amplificación de todos los códigos de barras simultáneamente en una reacción de PCR.
- 15 2. La composición según la reivindicación 1, en la que la molécula principal se selecciona de entre el grupo que consiste en polisacáridos, que incluyen glucanos tales como dextrano, una estreptavidina o un multímero de estreptamero.
3. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que
- 20 a. las dos o más moléculas de MHC están acopladas a la cadena principal a través de una unión de estreptavidina-biotina y/o estreptavidina-avidina y/o mediante la cadena pesada de MHC y/o mediante la cadena ligera (B2M), y/o
- b. la al menos una molécula de ácido nucleico está acoplada a la cadena principal a través de una unión de estreptavidina-biotina y/o una unión de estreptavidina-avidina.
- 25 4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho MHC multimérico comprende al menos cuatro moléculas de MHC, como al menos ocho, diez, de 2 a 30, de 2 a 20, de 2 a 10, de 4 a 10 o de 15 de 30 moléculas de MHC.
- 30 5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que cada una de las al menos una molécula de ácido nucleico presenta una longitud de 20 a 200 nucleótidos, como de 20 a 150, de 20 a 100, de 30 a 100, tal como de 30 a 80 o de 30 a 50 nucleótidos.
6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la al menos una molécula
- 35 de ácido nucleico comprende o consiste en ADN, ARN y/o nucleótidos artificiales tales como PNA o LNA.
7. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el MHC se selecciona de entre el grupo que consiste en un MHC de clase I, un MHC de clase II y un CD1.
- 40 8. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la cadena principal comprende además una o más etiquetas seleccionadas de entre el grupo que consiste en etiquetas fluorescentes, marcadores His, marcadores de iones metálicos y otros marcadores o etiquetas seleccionables.
9. Un procedimiento para detectar células sensibles a antígenos, como las células sensibles a antígenos
- 45 múltiples, en una muestra que comprende:
  - i) proporcionar una composición que comprende un conjunto de diferentes subconjuntos de MHC multimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8;
  - ii) poner en contacto dicha composición con dicha muestra; y
  - iii) detectar la unión de cada uno de los MHC multiméricos a dichas células sensibles a antígenos, detectando así
  - 50 las células sensibles a un antígeno presente en cada subconjunto de MHC multiméricos, en el que dicha unión se detecta amplificando las regiones de código de barras de dichas moléculas de ácido nucleico unidas a uno o más MHC multiméricos por PCR.
10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que la muestra se selecciona de entre el grupo que
- 55 consiste en una muestra de sangre, tal como una muestra de sangre periférica; una muestra derivada de sangre; una muestra de tejido y un fluido corporal, como líquido cefalorraquídeo o saliva.
11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en el que el procedimiento comprende además una o más etapas de selección celular mediante un procedimiento seleccionado de entre el grupo que consiste
- 60 en: citometría de flujo tal como FACS; selección basada en cuentas magnéticas; exclusión de tamaño; centrifugación en gradiente; fijación de columna y filtración en gel.

12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que las regiones de código de barras amplificadas de cada una de dichas moléculas de ácido nucleico unidas a cada subconjunto de MHC multiméricos se detectan por secuenciación de dichas regiones de código de barras, por secuenciación profunda, secuenciación de alto rendimiento, secuenciación de próxima generación o mediante la detección de dicha región de código de barras por PCR.

13. Un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad o afección, preferentemente cáncer y/o enfermedades infecciosas, siendo que dicho procedimiento comprende:

- i) proporcionar una muestra obtenida de un mamífero,
- 10 ii) proporcionar un complejo mayor de histocompatibilidad multimérico que comprende i) dos o más moléculas de MHC unidas a una molécula principal, y ii) al menos una molécula de ácido nucleico unida a dicha cadena principal, dicha al menos una molécula de ácido nucleico que comprende una primera región de cebador 5', una región central (región de código de barras) y una segunda región de cebador 3', en la que dicho código de barras sirve como una etiqueta específica para una molécula péptido-MHC dada; o una composición según las reivindicaciones
- 15 1 a 8,
- iii) poner en contacto dicho MHC multimérico o dicha composición con dicha muestra; y
- iv) detectar la unión del MHC multimérico a las células sensibles a antígenos en dicha muestra, en donde dicha unión se detecta amplificando las regiones del código de barras de dichas moléculas de ácido nucleico unidas a uno o más MHC multiméricos por PCR, diagnosticando así dicha enfermedad o afección.
- 20



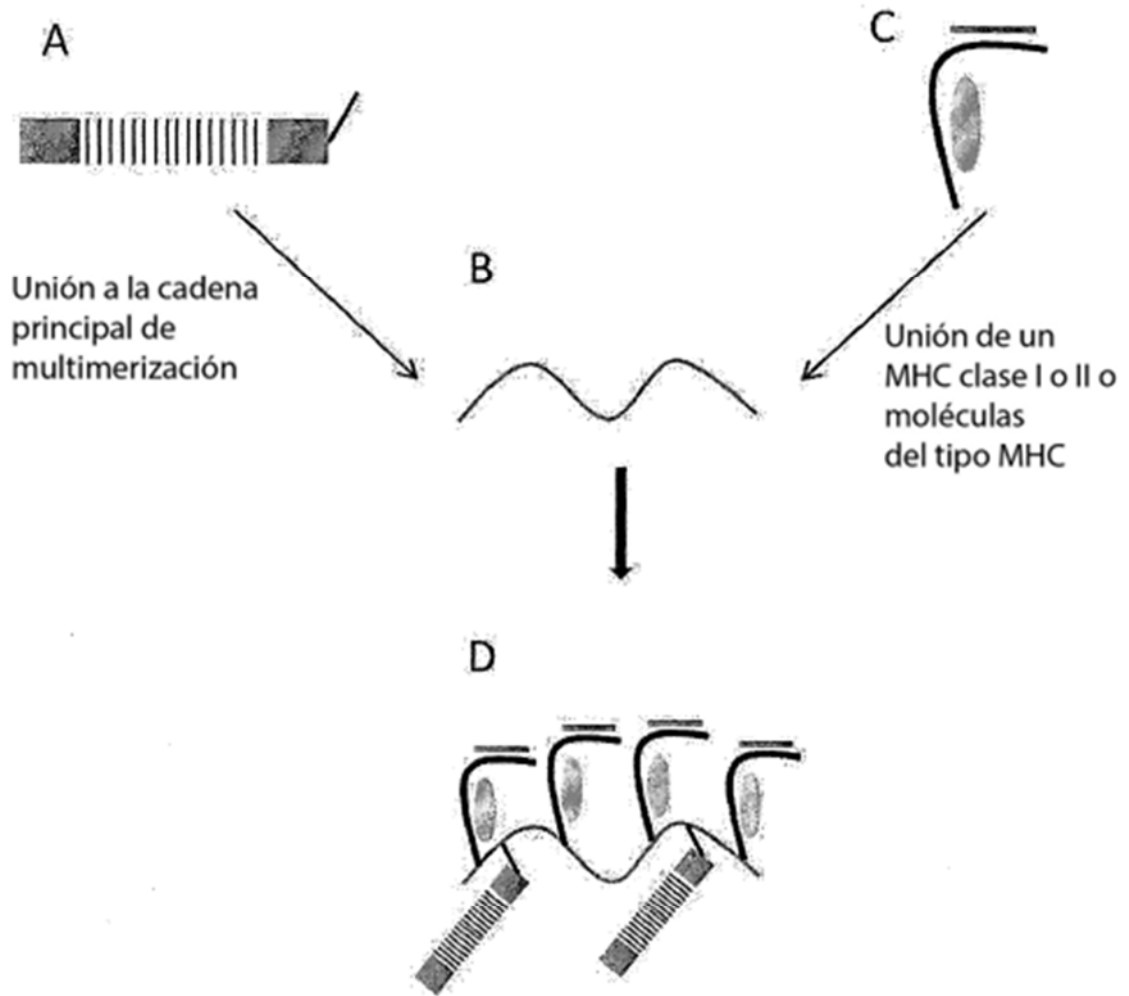


Fig. 1

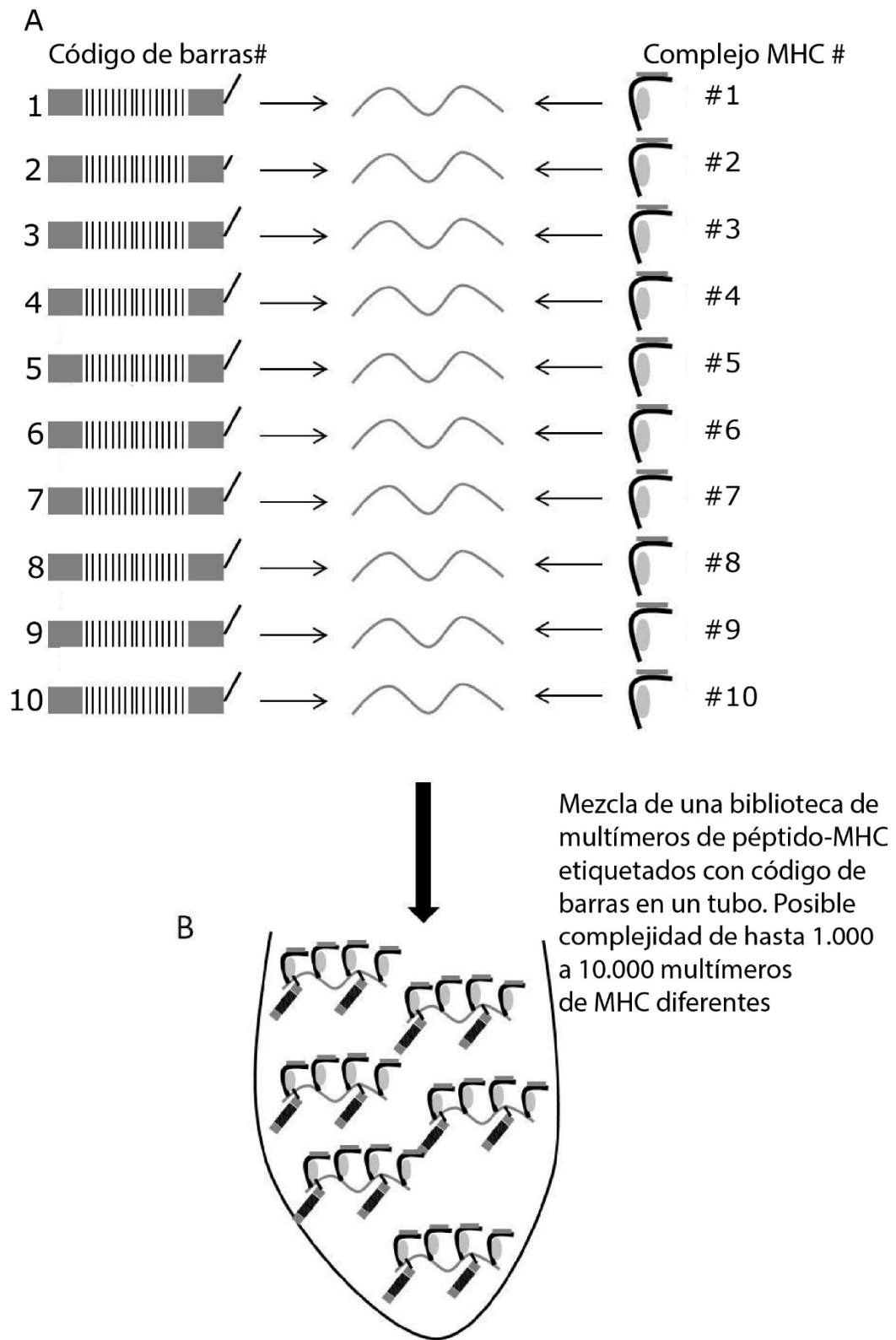


Fig. 2

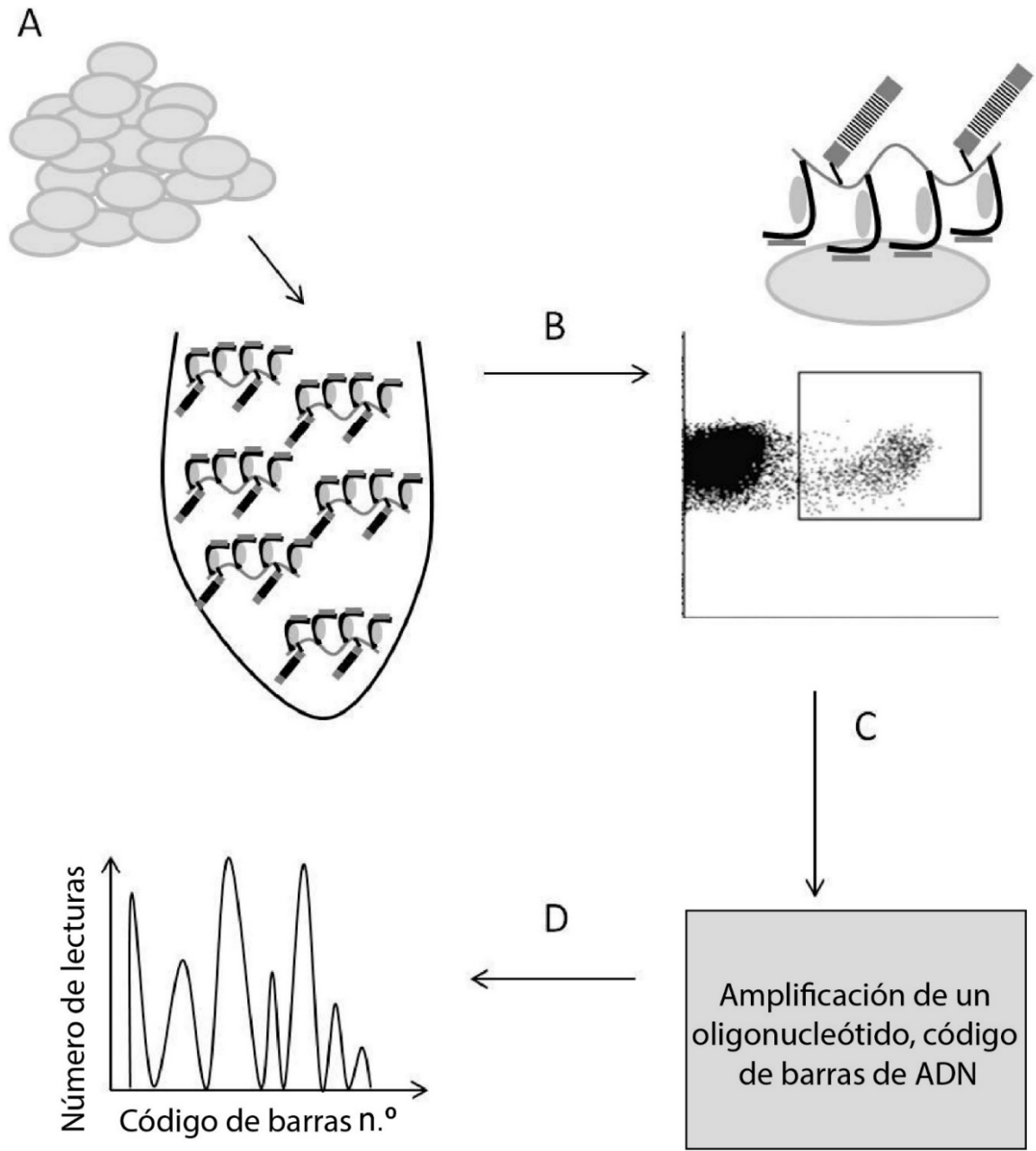


Fig. 3

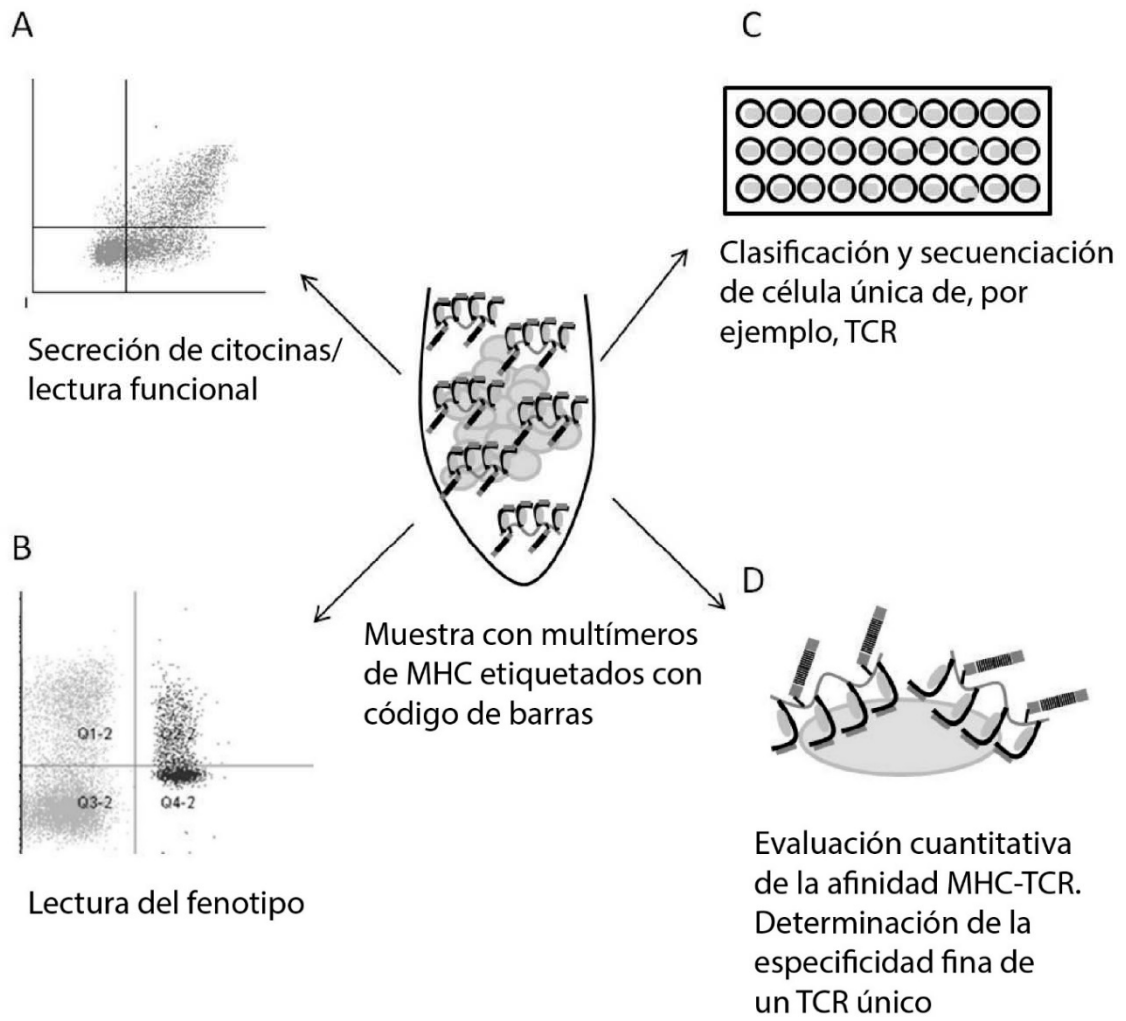


Fig. 4

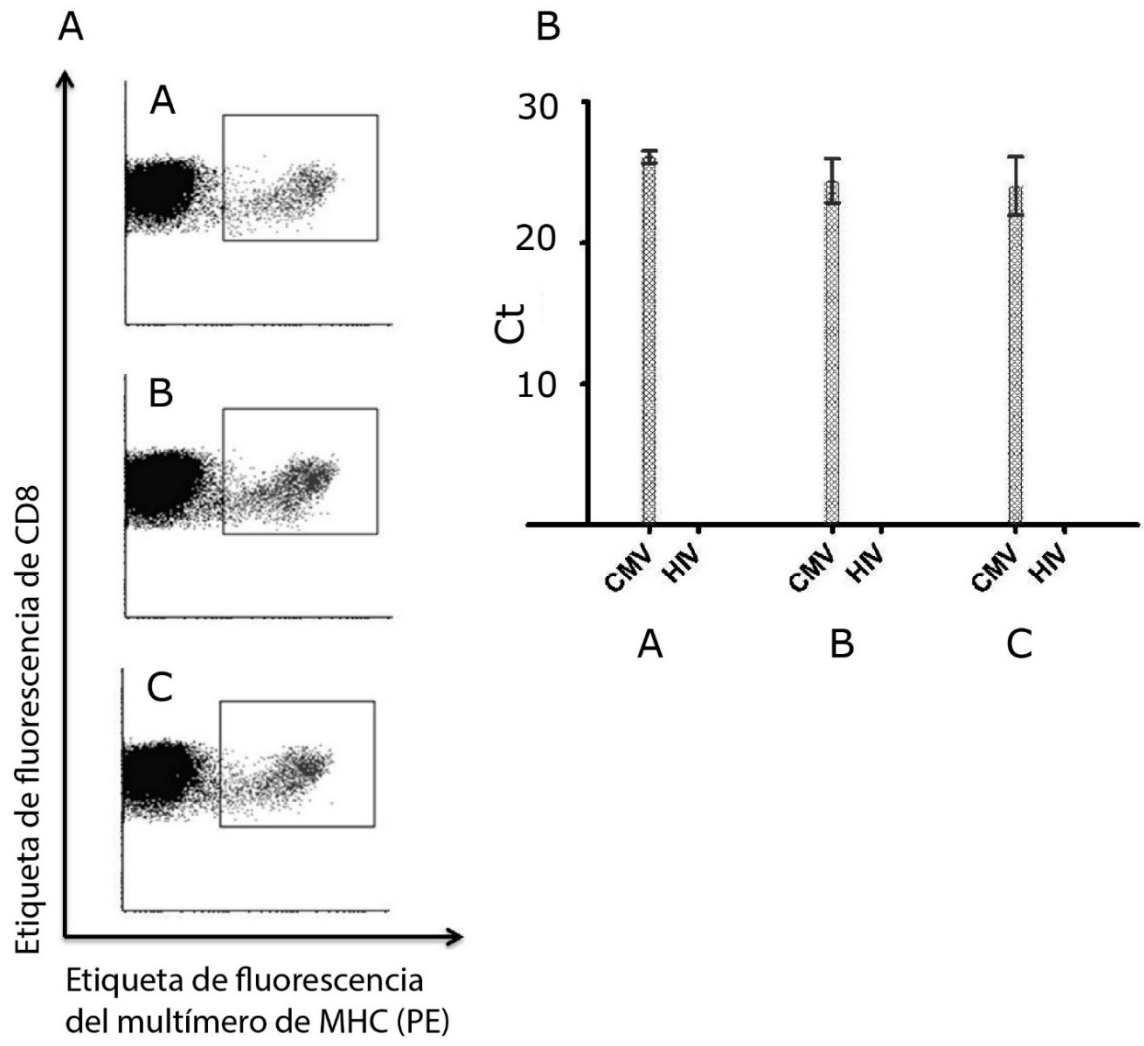


Fig. 5

**Estabilidad de codones de oligo de ADN en sangre (EDTA)  
durante una incubación de 24 h (captura de MACS)**

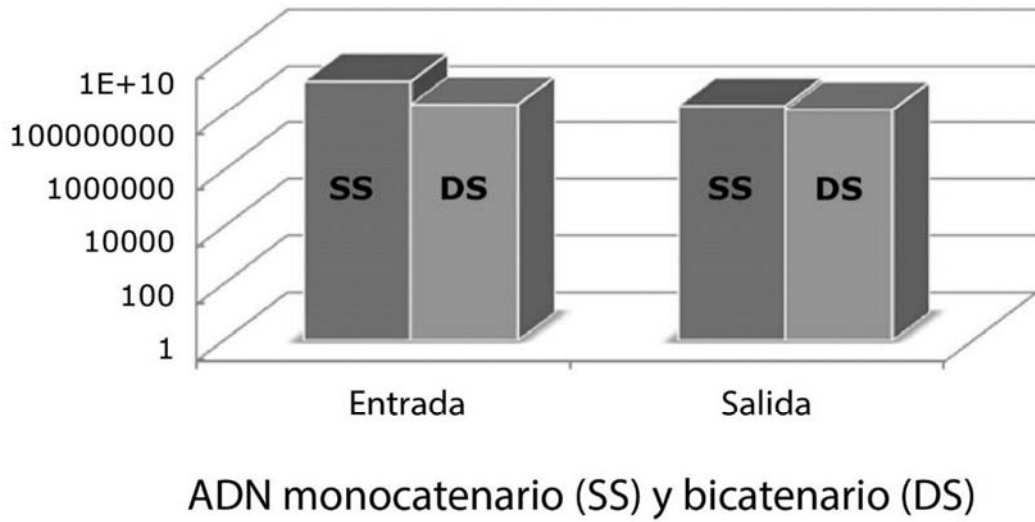


Fig. 6

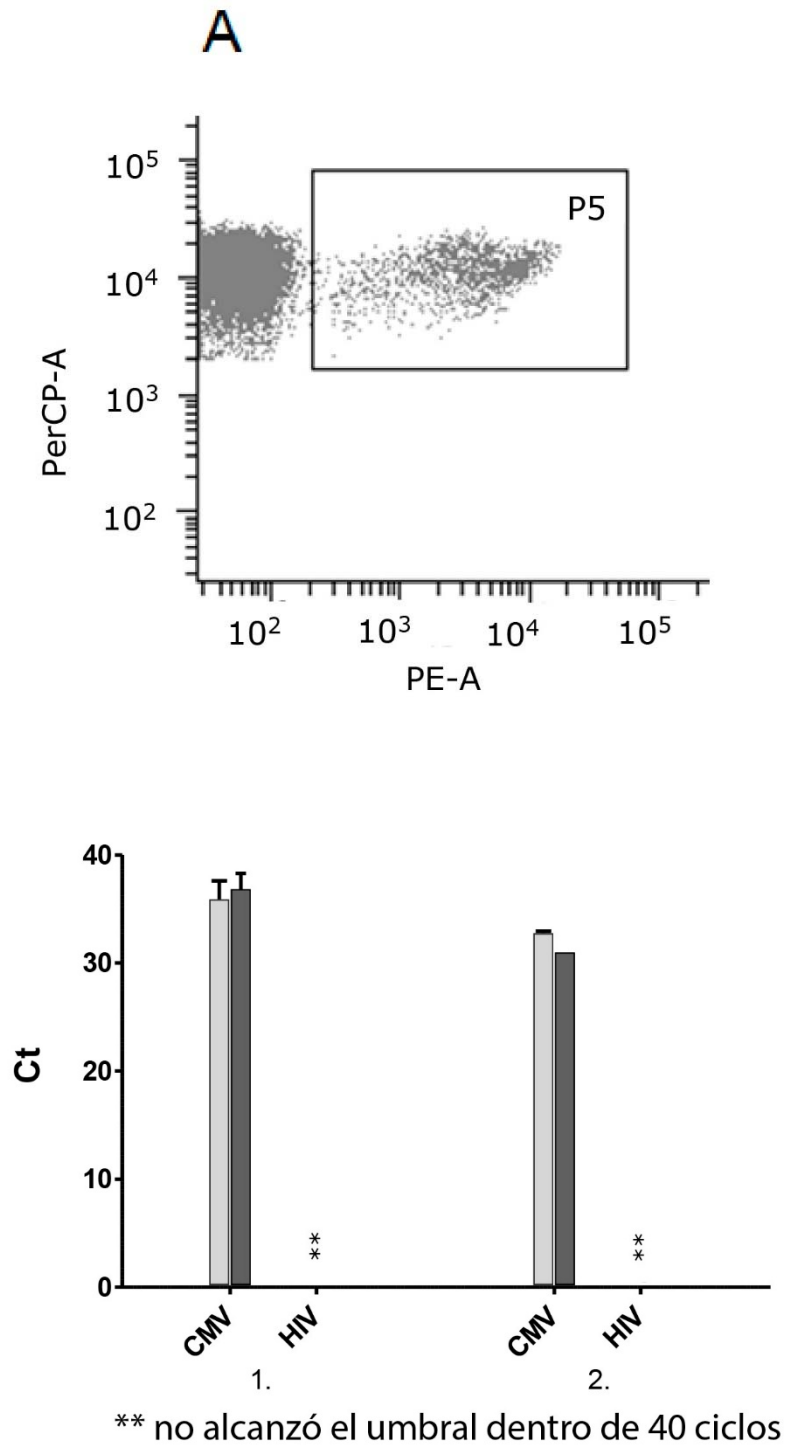


Fig 7

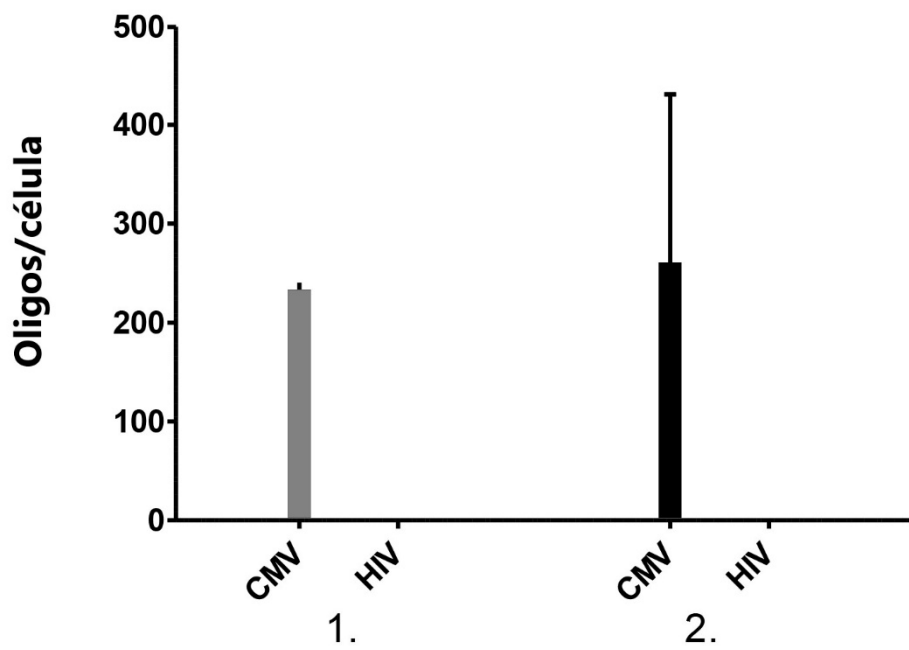
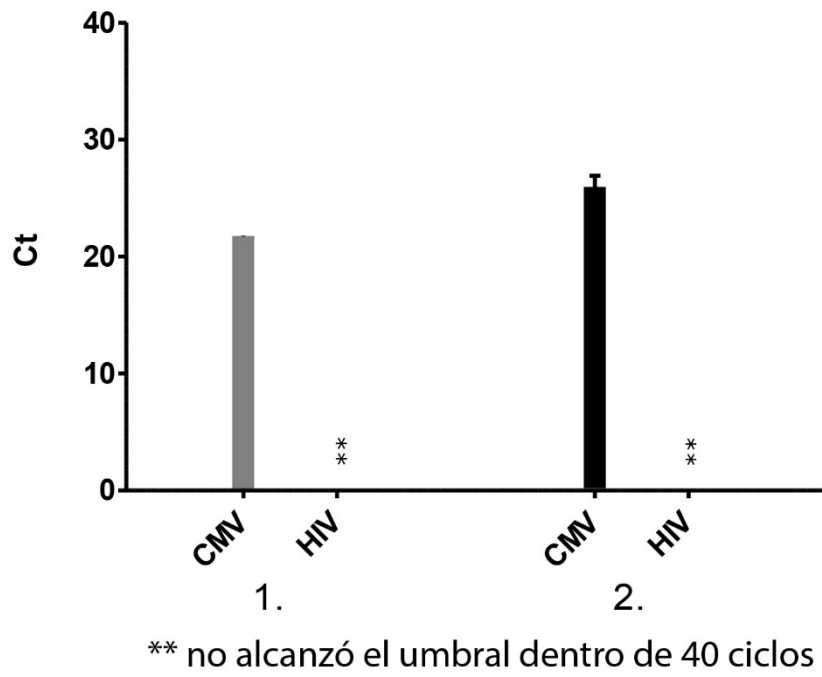
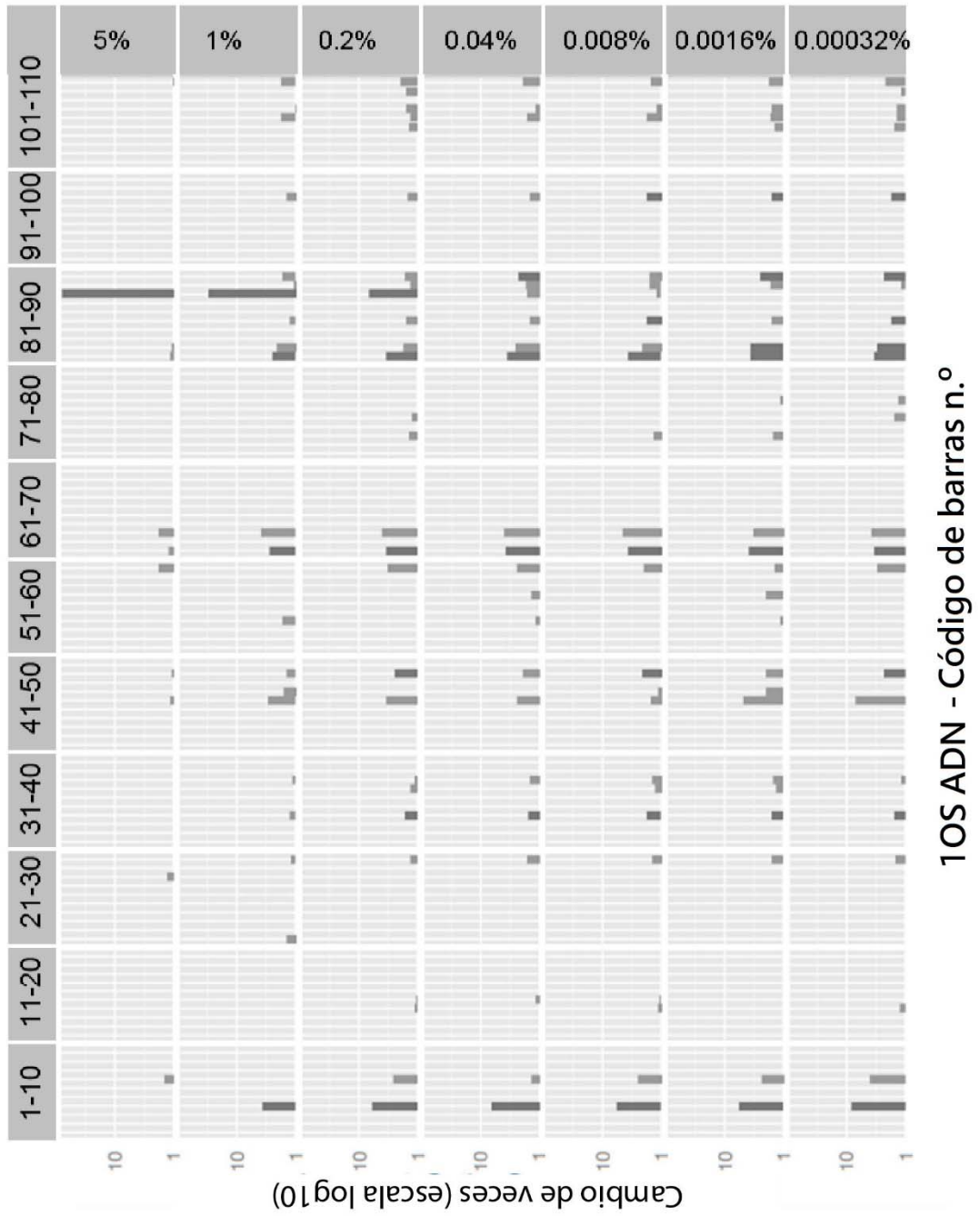


Fig 8





**signif**  
 ■  $p < 0.05$   
 ■  $p \geq 0.05$

Fig 9

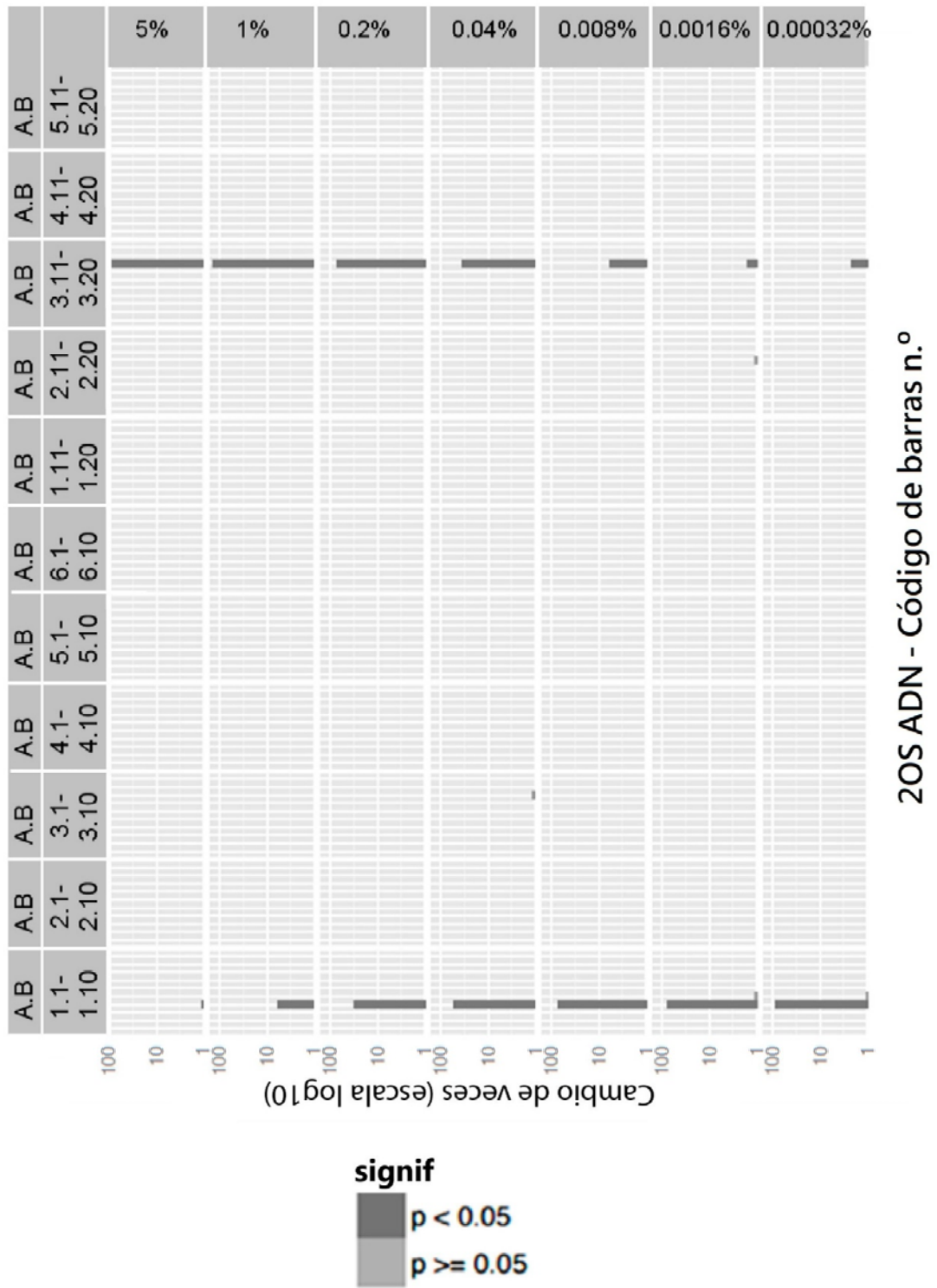
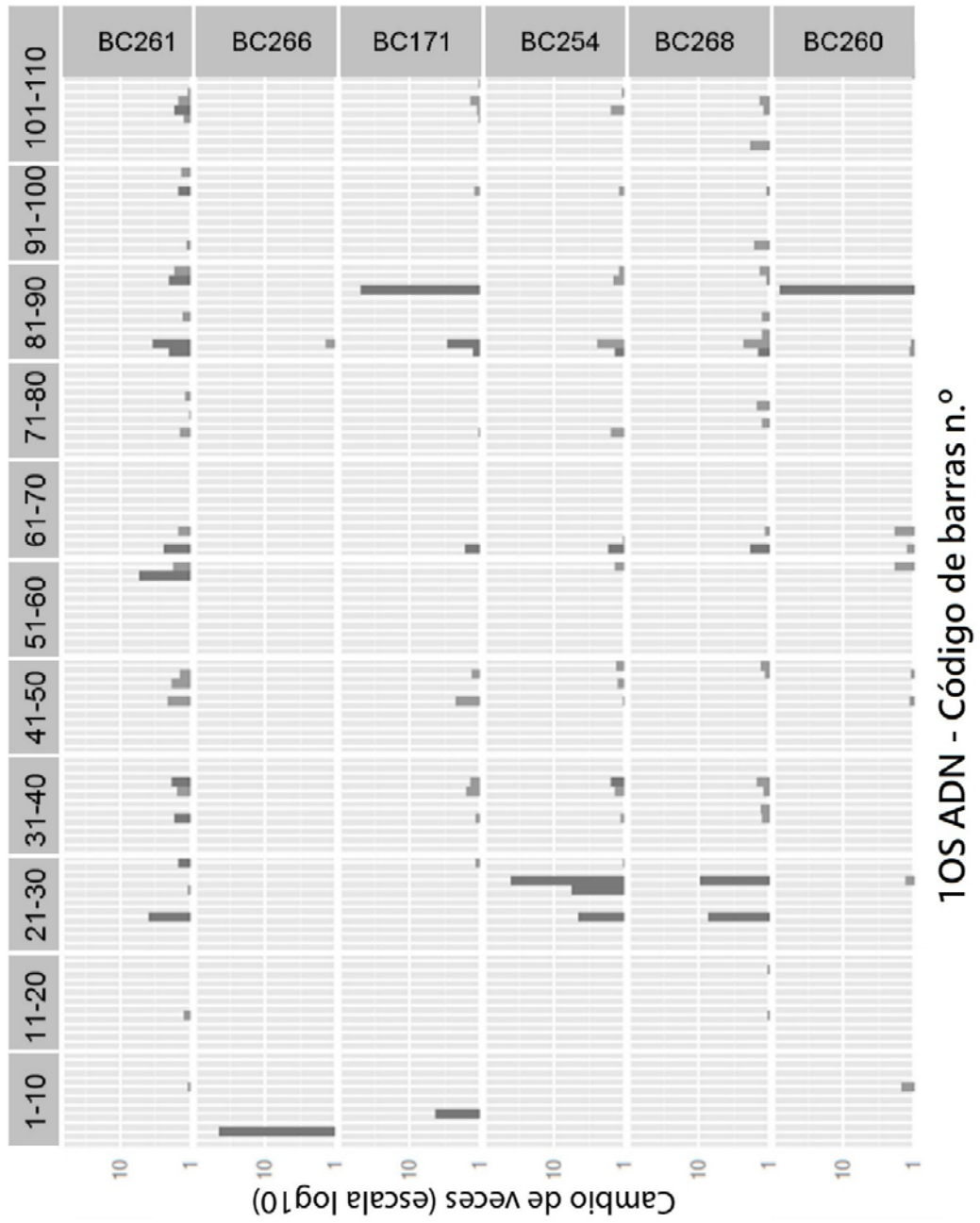


Fig 10



signif

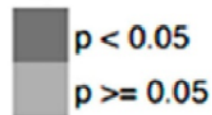
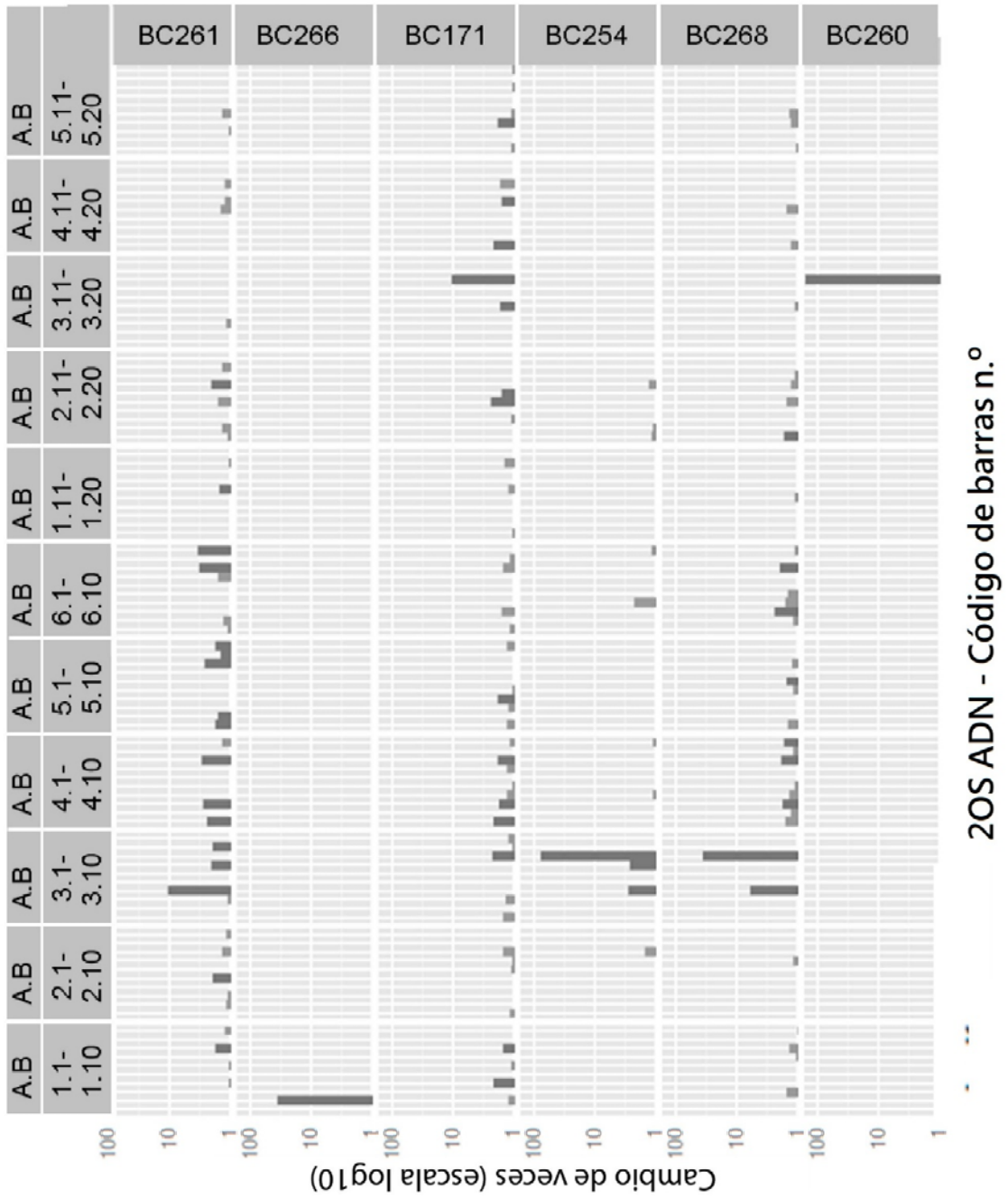


Fig 11



**signif**  
 ■ p < 0.05  
 ■ p >= 0.05

Fig 12