

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 999 411**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 14/74 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2015** **E 20212399 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2024** **EP 3851450**

54 Título: **Receptores de antígenos quiméricos y métodos de uso**

30 Prioridad:

19.12.2014 EP 14199148

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2025

73 Titular/es:

ETH ZÜRICH (100.00%)
Rämistrasse 101
8092 Zürich, CH

72 Inventor/es:

KISIELOW, JAN;
OBERMAIR, FRANZ-JOSEF y
KOPF, MANFRED

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 999 411 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

Receptores de antígenos quiméricos y métodos de uso

5 La mayoría de las células T expresan receptores de células $\alpha\beta$ T (TCR) y reconocen antígenos en forma de péptidos (epítomos) presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) sobre otras células. Los TCR de los linfocitos T citotóxicos reconocen epítomos mostrados por moléculas de CMH de clase I en la superficie de casi todas las células del cuerpo. Los TCR de las células T auxiliares reconocen epítomos presentados por moléculas de CMH de clase II en la superficie de células inmunitarias presentadoras de antígenos, incluyendo macrófagos, células dendríticas y células B. El reconocimiento eficiente del epítomo por las células T implica glicoproteínas adicionales de superficie de células T: CD8 en linfocitos T citotóxicos (células T CD8⁺) y CD4 en células T auxiliares (células T CD4⁺), que se unen a moléculas de CMH de clase I y II, respectivamente. La unión de un TCR a un epítomo puede dar como resultado que se envíen señales al núcleo del linfocito T para inducir una respuesta de células T.

15 La identificación inequívoca y eficiente de las especificidades antigénicas de las células T es una gran promesa para el desarrollo de herramientas de diagnóstico y terapias inmunitarias eficaces. En particular:

- puede ayudar a evaluar la seguridad de las terapias adoptivas con células T,

20 - puede permitir nuevos enfoques en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, cáncer y en el desarrollo de nuevas vacunas.

25 Sin embargo, los TCR se unen a complejos de CMH-péptido con baja afinidad, lo que hace que los métodos de presentación en fagos y levaduras sean ineficaces. Métodos alternativos, como el cribado de bibliotecas combinatorias de péptidos de exploración posicional, aprovechan la reactividad cruzada del TCR y usan conjuntos de péptidos para definir motivos que conducen a la activación de células T. Aparte de restricciones de afinidad similares, estos métodos engorrosos adolecen de una alta tasa de resultados falsos positivos. Debido a que se interrogan secuencias de péptidos al azar, los motivos peptídicos identificados son ambiguos o no tienen una homología clara con las proteínas nativas.

30 Zhang *et al.* (FASEB J, 20 de enero de 2004, DOI: 10.1096/fj.03-0881fje) dan a conocer un receptor de antígeno transgénico que comprende un dominio transmembrana de cadena α o β IA de CMH de clase II y un dominio intracelular de cadena zeta de CD247.

35 Jyothi M.D. *et al.* Nat. Biotechnol. 20/12, diciembre de 2002, 1215-1220 dan a conocer un receptor de antígeno transgénico que tiene un dominio extracelular de CMH de clase I.

El documento US 2008/286312 muestra un receptor de antígeno transgénico que comprende una beta2-microglobulina unida a un receptor de tipo Toll de dominio citoplasmático de CD40.

40 El problema que subyace a la presente invención es proporcionar los medios para la identificación directa y sensible, sin sesgos de las especificidades de péptidos antigénicos de células T CD4⁺ y CD8⁺ para su uso *in vitro* e *in vivo*. Este problema se soluciona mediante la materia de las reivindicaciones independientes.

45 Términos y definiciones

Se facilitan secuencias de aminoácidos de extremo amino a carboxilo terminal. Las letras mayúsculas para las posiciones de secuencia se refieren a L-aminoácidos en el código de una letra (Stryer, Biochemistry, 3ª ed. pág. 21). Las letras minúsculas para las posiciones de secuencia de aminoácidos se refieren a los D- o (2R)-aminoácidos correspondientes.

55 En el contexto de la presente invención, los términos "identidad" o "identidad de secuencia" se utilizan en su significado conocido en la técnica de genética y bioinformática; se refieren a un único parámetro cuantitativo que representa el resultado de una comparación de secuencia posición por posición. En la técnica se conocen métodos de comparación de secuencias; el algoritmo BLAST disponible públicamente es un ejemplo.

Un ejemplo de este tipo para la comparación de secuencias de aminoácidos es el algoritmo BLASTP que usa parámetros por defecto tales como: umbral de espera: 10; tamaño de palabra: 3; coincidencias máximas en un intervalo de consulta: 0; matriz: BLOSUM62; costes de hueco: existencia 11, extensión 1; ajustes de composición: ajuste de matriz de puntuación de composición condicional. En ausencia de detalles adicionales, estos ajustes se usan para la determinación de los valores de identidad de secuencia de aminoácidos facilitados a continuación.

65 Un ejemplo de este tipo para la comparación de secuencias de ácido nucleico es el algoritmo BLASTN que usa los parámetros por defecto: umbral de espera: 10; tamaño de palabra: 28; coincidencias máximas en un intervalo de consulta: 0; puntuaciones de coincidencia/falta de coincidencia: 1-2; costes de hueco: lineal. En ausencia de detalles adicionales, estos ajustes se usan para la determinación de los valores de identidad de secuencia de ácido nucleico

facilitados a continuación.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, se usa el término “complejo mayor de histocompatibilidad” (CMH) en su significado conocido en la técnica de biología celular y bioquímica; se refiere a una molécula de superficie celular que presenta un péptido, una fracción de una proteína, de un modo adecuado para el reconocimiento por un receptor de células T. Los péptidos reconocidos por el sistema inmunitario se denominan “epítomos” o “péptidos antigénicos” u “oligopéptidos” en el contexto de la presente memoria descriptiva.

Hay dos clases principales de moléculas de CMH: clase I y clase II.

CMH de clase I se produce como una cadena α compuesta por tres dominios, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$. El dominio $\alpha 3$ interacciona con la molécula que no es de CMH $\beta 2$ -microglobulina. El péptido que se muestra o se presenta se sostiene mediante la ranura de unión a péptido, en la región central del heterodímero $\alpha 1/\alpha 2$. La subunidad $\alpha 3$ contiene un dominio transmembrana, que ancla la molécula de CMH de clase I a la membrana celular.

CMH de clase II está formado por dos cadenas, α y β , teniendo cada una dos dominios, $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y $\beta 1$ y $\beta 2$, respectivamente. La ranura de unión a péptido (el elemento estructural formado por la molécula de CMH de clase II que presenta o muestra el epítipo peptídico) está formada por el heterodímero de $\alpha 1$ y $\beta 1$. Las subunidades $\alpha 2$ y $\beta 2$ contienen dominios transmembrana que anclan la molécula de CMH de clase II a la membrana celular.

Las moléculas de CMH de clase I y de clase II comprenden en su forma inmadura un péptido señal como la mayoría de las proteínas recién sintetizadas que están destinadas a la vía secretora. La secuencia de péptido señal de CMH se ubica en el sentido de (5') del dominio de CMH $\alpha 1$ en la molécula de ARNm de CMH. Después de la escisión del péptido señal, la molécula de CMH se conoce como la molécula de CMH madura.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, se usa el término dominio de “ $\beta 2$ -microglobulina” en su significado conocido en la técnica de biología celular y bioquímica; se refiere a una molécula que no es de CMH que forma parte de la molécula de heterodímero de CMH de clase I. En otras palabras, constituye la cadena β del heterodímero de CMH de clase I.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, se usa el término “receptor de células T” (TCR) en su significado conocido en la técnica de biología celular y bioquímica; se refiere a una molécula que se encuentra en la superficie de las células T que es capaz de reconocer antígenos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. Los TCR son heterodímeros anclados a la membrana unidos por disulfuro que consisten en cadenas α y β altamente variables. Cada cadena se compone de dos dominios extracelulares: región variable (V) y una región constante (C). La región variable se une al complejo de péptido-CMH; la región constante es proximal a la membrana celular, seguida de una región de bisagra, región transmembrana y una cola citoplasmática corta.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, se usa el término “complejo de receptor de células T” en su significado conocido en la técnica de biología celular e inmunología; se refiere a un complejo octamérico del TCR α/β heterodimérico, con dos módulos de señalización heterodiméricos CD3 ϵ/δ y CD3 γ/ϵ y el homodímero CD247 ζ/ζ (también conocido como cadena ζ o cadena zeta de TCR). Los residuos ionizables en el dominio transmembrana de cada subunidad forman una red polar de interacciones que mantienen unido el complejo. Dado que la cola citoplasmática del TCR α/β es extremadamente corta, haciendo que sea poco probable que participe en la señalización, estas moléculas de señalización son vitales en la propagación de la señal desde el TCR activado al interior de la célula. El mecanismo más común para la activación y regulación de moléculas debajo de la membrana plasmática es a través de fosforilación/desfosforilación por proteína cinasas. Las partes intracelulares de CD3 y CD247 ζ contienen motivos de activación basados en tirosina inmunorreceptora (ITAM) que la familia Src de tirosina cinasas seleccionan como diana.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término “funcionalmente unido” se refiere a la unión del estado de actividad de dos funciones diferentes. Por ejemplo, un polipéptido receptor (función 1) puede estar funcionalmente unido a un gen indicador y su promotor (función 2); entonces, si el receptor cambia su estado de actividad (por ejemplo, activado), el promotor del gen indicador también cambiará su estado de actividad (por ejemplo, activado) y el gen indicador se transcribe. Un ejemplo no limitativo de este tipo es el factor nuclear de la ruta de señalización de células T activadas (NFAT) conocida en la técnica. La activación de TCR nativos (función 1) en las células T da como resultado la activación de proteína cinasas y fosfatasas que inician la importación nuclear del factor de transcripción NFAT conduciendo a la expresión de los genes diana de NFAT (función 2). En otras palabras, el TCR está funcionalmente unido a la expresión de genes diana de NFAT.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término “activación del gen indicador” se refiere a un cambio en el estado de actividad del gen indicador. Un ejemplo de un cambio de este tipo en el estado de actividad es la activación del promotor de un indicador gen. Esto da como resultado el aumento de la transcripción/traducción del gen indicador. Otro ejemplo es la escisión de un inhibidor de la proteína indicadora que da como resultado una mayor cantidad de proteína indicadora activa.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término “transgénico” se usa en su significado conocido en la técnica de biología celular; se refiere a la introducción de una secuencia de ácido nucleico exógeno en un organismo vivo de modo que este organismo presenta una nueva propiedad que no posee endógenamente.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, se usa el término “receptor de antígeno” en su significado conocido en la técnica de biología celular e inmunología; se refiere a receptores de superficie capaces de unirse a antígenos o epítopos. Ejemplos de receptores de antígeno son receptores de células B y de células T.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término “receptor de antígeno quimérico” se refiere a los receptores artificiales modificados por ingeniería genética que comprende partes de receptores de antígeno. Un ejemplo no limitativo es un receptor híbrido que comprende dominios de receptores de células T o de células B fusionados con dominios de CMH y/o secuencias de péptidos antigénicos.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término “oligopéptido” o “secuencia de oligopéptido” se refiere exclusivamente a oligopéptidos reactivos de células T que, cuando se presentan en el contexto de una molécula de CMH en una célula, pueden provocar una respuesta de células T si los reconoce un receptor de células T relacionado. Cuando se menciona que una secuencia de oligopéptidos está compuesta por un polipéptido (más largo) de la invención, el experto comprenderá que esto se refiere a una secuencia de oligopéptido que puede reconocerse por un TCR cuando se presenta sobre una molécula de CMH. La secuencia de oligopéptidos comprende, además del epítipo reactivo de células T presentado por CMH, un ligador de varios aminoácidos, que permite que el epítipo reactivo de células T se ajuste en la molécula de CMH. A continuación, se facilitan ejemplos de la longitud y la secuencia del ligador.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para la identificación de una secuencia peptídica reconocible por TCR, que comprende las etapas de:

i. proporcionar una pluralidad de células de mamífero, en el que

- cada una de la pluralidad de células de mamíferos expresa a un miembro de una biblioteca,
- cada miembro de la biblioteca codifica para una molécula de receptor de antígeno transgénico,
- la molécula de receptor de antígeno transgénico comprende

- un dominio extracelular de CMH1 o CMH2,

- un oligopéptido comprendido dentro de la secuencia polipeptídica de la secuencia del dominio extracelular (el término “dentro” pretende significar que el oligopéptido puede estar comprendido en cualquier lugar entre el límite N y C de la secuencia del dominio extracelular, o en cualquiera de sus extremos respectivos), en el que el oligopéptido es diferente para cada miembro de la biblioteca, y en el que el oligopéptido se presenta de un modo adecuado para el reconocimiento por un receptor de células T,

- un dominio transmembrana de un receptor de células T (TCR), y

- un dominio intracelular de un TCR,

- la molécula de receptor de antígeno transgénico está funcionalmente unida a una proteína indicadora, mediante lo cual la unión de un receptor de células T relacionado al receptor de antígeno transgénico da como resultado la activación del gen indicador.

ii. Poner en contacto la pluralidad de células de mamíferos con una preparación de linfocitos T capaces de unirse a la secuencia de oligopéptido comprendida en el receptor de antígeno transgénico a través de un receptor de células T expresado en la superficie de los linfocitos T.

iii. Separar las células con una proteína indicadora detectable de dicha pluralidad de células de mamíferos según el nivel de proteína indicadora detectable, dando lugar de ese modo a células activadas.

iv. Aislar ADN que codifica para el miembro de la biblioteca expresado a partir de las células activadas.

v. Secuenciar la secuencia de oligopéptido comprendida en el receptor de antígeno transgénico expresado en las células activadas. La secuencia determinada del oligopéptido es la secuencia peptídica reconocible por TCR.

En otras palabras, el método de la invención permite evaluar el potencial antigénico de los oligopéptidos, o (para ser más preciso) el potencial de una secuencia de oligopéptido particular de ser un epítipo presentado por CMH que desencadena una respuesta de TCR relacionada. Para llevar a cabo esta evaluación, se requiere una biblioteca de

receptores de antígenos transgénicos que comprende oligopéptidos potencialmente antigénicos. Un miembro de la biblioteca se expresa en cada célula de mamífero de la pluralidad de células, en donde la secuencia de oligopéptido puede ser diferente para cada miembro de la biblioteca. El oligopéptido se presenta por el receptor de antígeno transgénico de una manera que es adecuada para el reconocimiento por un receptor de células T. La unión del oligopéptido antigénico por los linfocitos T proporcionados a través de su receptor de células T activa la proteína indicadora que está funcionalmente unida al receptor de antígeno transgénico. La célula de mamífero se separa entonces según el nivel de indicador detectable. El ADN se aísla de la célula de mamífero separada y el ADN del oligopéptido comprendido se secuencia. Cada oligopéptido recuperado por este método es reconocido por un receptor de células T.

El receptor de antígeno transgénico comprende un oligopéptido que se presenta de un modo adecuado para el reconocimiento por un receptor de células T, un dominio extracelular de CMH1 o CMH2, un dominio transmembrana de un receptor de células T y un dominio intracelular de un receptor de células T. El oligopéptido y los diferentes dominios están covalentemente unidos formando una sola cadena polipeptídica (extracelular-transmembrana-intracelular). En ciertas realizaciones, el receptor transgénico comprende adicionalmente una región de bisagra de un receptor de células T que se sitúa entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, los términos "expresa" o "expresión" se usan en su significado en la técnica de biología celular y biología molecular; se refieren a la transcripción y traducción de una secuencia de ADN y del ARNm derivado.

En ciertas realizaciones la separación de células con una proteína indicadora detectable de la pluralidad de células de mamífero según el nivel de proteína indicadora detectable tal como se describe en la etapa iii. se realiza al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces. Esta realización es particularmente ventajosa si se usan bibliotecas de alta complejidad.

Según un aspecto alternativo de la invención, se proporciona un método para la identificación de una secuencia de péptido reconocible por TCR. El método comprende:

i. proporcionar una célula de mamífero, en el que

- la célula de mamífero expresa una molécula de receptor de antígeno transgénico;
- la molécula de receptor de antígeno transgénico comprende
 - un dominio extracelular de CMH1 o CMH2 que comprende un oligopéptido presentado de un modo adecuado para el reconocimiento por un receptor de células T,
 - un dominio transmembrana de un receptor de células T (TCR), y
 - un dominio intracelular de un TCR,
- la molécula de receptor de antígeno transgénico está funcionalmente unida a una proteína indicadora, mediante lo cual la unión de un receptor de células T al receptor de antígeno transgénico da como resultado la activación de dicho gen indicador.

ii. Poner en contacto la célula de mamífero con una preparación de linfocitos T capaces de unirse al oligopéptido comprendido en el receptor de antígeno transgénico a través de un receptor de células T expresado en la superficie del linfocito T. La unión del receptor de células T al receptor de antígeno transgénico activa el gen indicador, dando lugar a una célula de mamífero activada.

iii. Aislar el ADN que codifica para el miembro expresado de la biblioteca de la célula de mamífero activada.

iv. Secuenciar la secuencia de oligopéptido comprendida en el receptor de antígeno transgénico.

En ciertas realizaciones, el receptor de antígeno transgénico comprende adicionalmente una región de bisagra. En ciertas realizaciones según el aspecto primero y segundo de la invención, el receptor de antígeno transgénico es un receptor de antígeno transgénico ya conocido en la técnica. Se dan a conocer ejemplos de receptores de antígenos transgénicos adecuados conocidos en la técnica en Jyothi *et al.*, Nat Biotechnol 20, 1215-1220 (2002); Geiger *et al.*, Blood 98(8) 2364-2371 (2001); documento US2008286312A1; Mekala *et al.*, PNAS 102(33), 11817-11822, (2005); Moisini *et al.*, J Immunol (2008), 180:3601-3611; Scott *et al.*, J Autimm 35, 390-397 (2010).

En ciertas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, el receptor de antígeno transgénico es un heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, y

a. el primer polipéptido comprende una parte extracelular de la cadena alfa del complejo mayor de histocompatibilidad

I (CMH de clase I) y el segundo polipéptido comprende un dominio de β 2-microglobulina, o

b. el primer polipéptido comprende una parte extracelular de la cadena alfa del complejo mayor de histocompatibilidad II (CMH de clase II) y el segundo polipéptido comprende una parte extracelular de la cadena beta del complejo mayor de histocompatibilidad II (CMH de clase II).

Al menos una de la primera y la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente un oligopéptido, covalentemente unido al dominio extracelular de CMH, en el que el oligopéptido puede ser reconocido por un receptor de células T.

En ciertas realizaciones, la secuencia de oligopéptido comprende además una secuencia de ligador de 4 a 16 aminoácidos, particularmente 6, 8, 10, 12 o 14 aminoácidos de longitud. En ciertas realizaciones, el ligador se compone predominantemente de glicina y una de serina, treonina y alanina. En ciertas realizaciones, el ligador comprende glicina y serina solamente.

Uno del primer polipéptido y el segundo polipéptido comprende además una región de bisagra, un dominio transmembrana y un dominio intracelular o cola intracelular de la cadena alfa del receptor de células T y el otro del primer polipéptido y el segundo polipéptido comprende una región de bisagra, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de la cadena beta del receptor de células T.

En ciertas realizaciones, se insertan la secuencia de oligopéptido y un ligador de glicina-serina entre el último aminoácido del péptido señal/líder de CMH y el primer aminoácido del dominio α 1 o dominio β 1 de CMH.

En ciertas realizaciones, se inserta la secuencia de oligopéptido y una secuencia de ligador después del aminoácido 1, 2, 3, 4 o 5 de la secuencia de dominio α 1 o de la secuencia de dominio β 1 de CMH. La unión del péptido a la cadena beta (dominio β 1) insertará el péptido en el CMH en la dirección más comúnmente encontrada. Al unirlo a la cadena alfa, se insertará el péptido en una orientación inversa.

En ciertas realizaciones, se selecciona la parte extracelular de la molécula de CMH de la familia de genes HLA del complejo mayor de histocompatibilidad humano disponibles para el experto en la técnica en bases de datos especializadas tales como IMGT/HLA (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>). Alternativamente, la secuencia de HLA se deriva del ARN extraído de muestras de sangre o tejido del paciente.

En ciertas realizaciones, el oligopéptido tiene 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o 40 aminoácidos (AA) de longitud. La mayoría de los péptidos de CMH de clase I tiene 8-10 aminoácidos de longitud, mientras que el CMH de clase II puede presentar péptidos mucho más largos, ya que la hendidura de unión está abierta, sin embargo el epítipo real oscila entre 10 y 12 AA. En el método dado a conocer en el presente documento, los péptidos podrían ser incluso mayores de 20 (véase la figura 3, el péptido de LCMV encontrado por el método de invención comprende 24 AA). En ciertas realizaciones, se emplean oligopéptidos más grandes, ya que esto permite el cribado de más registros de unión en un péptido.

En ciertas realizaciones, la región de bisagra, la parte transmembrana e intracelular del antígeno transgénico en el primer y/o segundo polipéptido no se deriva de la misma cadena de TCR. En otras palabras, la región de bisagra o el dominio transmembrana de la cadena α de TCR podría estar conectado al dominio transmembrana o intracelular de la cadena β de TCR y viceversa.

En ciertas realizaciones, el heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico según el segundo aspecto de la invención comprende un primer polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos $\geq 80\%$, 85% , 90% , 92% , 94% , 95% , 96% , 97% , 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO 007 y un segundo polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos $\geq 80\%$, 85% , 90% , 92% , 94% , 95% , 96% , 97% , 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO 008.

La presente divulgación describe un heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido. El primer polipéptido está unido al segundo polipéptido por uno o varios enlaces de disulfuro, y

a. el primer polipéptido comprende una parte extracelular de la cadena alfa del complejo mayor de histocompatibilidad I (CMH de clase I) y el segundo polipéptido comprende un dominio de β 2-microglobulina asociado al complejo mayor de histocompatibilidad I (CMH de clase I), o

b. el primer polipéptido comprende una parte extracelular de la cadena alfa del complejo de histocompatibilidad II (CMH de clase II) y el segundo polipéptido comprende una cadena beta del complejo mayor de histocompatibilidad II (CMH de clase II).

Uno del primer polipéptido y el segundo polipéptido comprende además una región de bisagra, dominio

transmembrana (y el dominio intracelular o la cola) de la cadena alfa del receptor de células T (TCR) y el otro del primer polipéptido y el segundo polipéptido comprende una región de bisagra, dominio transmembrana (y el dominio intracelular o la cola) de la cadena beta del receptor de células T.

En otras palabras, el heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico es capaz de presentar un oligopéptido (epítipo) en un contexto de CMH, con el fin de que su TCR relacionado reconozca y se una al oligopéptido (epítipo). La unión de su TCR relacionado da como resultado la activación de los dominios intracelulares de las moléculas CD3 y CD247 asociadas con el heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico, lo que conduce a la activación de NFAT.

En ciertas realizaciones, las partes extracelulares de la molécula de CMH comprenden

i. dominios alfa1 y alfa2 y alfa3 y alfa3 de CMH de clase I en el primer polipéptido (además de β -2 microglobulina como segundo polipéptido), o

ii. dominios alfa1 y alfa2 de CMH de clase II en el primer polipéptido, y dominios beta1 y beta2 de CMH de clase II en el segundo polipéptido.

En ciertas realizaciones, el primer polipéptido comprende sustancialmente toda la parte extracelular de la cadena alfa del complejo mayor de histocompatibilidad I (CMH de clase I). En ciertas realizaciones, el primer polipéptido es la parte extracelular de la cadena alfa del complejo mayor de histocompatibilidad I (CMH de clase I).

En ciertas realizaciones, el segundo polipéptido comprende sustancialmente toda la parte extracelular del dominio de β 2-microglobulina asociado al complejo mayor de histocompatibilidad I (CMH de clase I). En ciertas realizaciones, el segundo polipéptido es el dominio de β 2-microglobulina asociado al complejo mayor de histocompatibilidad I (CMH de clase I).

En algunas otras realizaciones, el primer polipéptido comprende sustancialmente toda la parte extracelular de la cadena alfa del complejo mayor de histocompatibilidad II (CMH de clase II). En ciertas realizaciones, el primer polipéptido es la parte extracelular de la cadena alfa del complejo mayor de histocompatibilidad II (CMH de clase II). En ciertas realizaciones, el segundo polipéptido comprende sustancialmente toda la cadena beta del complejo mayor de histocompatibilidad II (CMH de clase II). En ciertas realizaciones, el segundo polipéptido es la cadena beta del complejo mayor de histocompatibilidad II (CMH de clase II).

En ciertas realizaciones, al menos una de la primera y segunda cadena de polipéptido comprende adicionalmente un péptido antigénico covalentemente unido al dominio extracelular de CMH, en el que dicho oligopéptido puede reconocerse por un receptor de células T.

En ciertas realizaciones, se insertan la secuencia de péptido antigénico y un ligador de glicina-serina entre el último aminoácido del péptido señal/líder de CMH y el primer aminoácido del dominio α 1 o dominio β 1 de CMH.

En ciertas realizaciones, se inserta la secuencia de péptido antigénico y una secuencia de ligador después de los aminoácidos 1, 2, 3, 4 o 5 de la secuencia del dominio α 1 o de la secuencia de dominio β 1 de CMH.

En ciertas realizaciones, la parte extracelular de la molécula de CMH se selecciona de la familia de genes HLA del complejo de mayor de histocompatibilidad humano disponible en bases de datos especializadas tales como IMGT/HLA (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>). Alternativamente, la secuencia de HLA se deriva del ARN extraído de muestras de sangre o tejido del paciente.

En ciertas realizaciones, el oligopéptido tiene 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o 40 aminoácidos de longitud. La mayoría de los péptidos de CMH de clase I tienen 8-10 aminoácidos de longitud, mientras que CMH de clase II puede presentar péptidos mucho más largos, ya que la hendidura de unión está abierta, sin embargo el epítipo real está dentro de 10-12 AA. En el método dado a conocer en el presente documento, los péptidos podrían ser incluso mayores de 20 (véase la figura 3, el péptido de LCMV encontrado por el método de invención comprende 24 AA). Podría ser ventajoso tener oligopéptidos más grandes, ya que esto permite el cribado de más registros de unión en un péptido.

En ciertas realizaciones, la región de bisagra, la parte transmembrana e intracelular del polipéptido del receptor de antígeno quimérico en el primer y/o segundo polipéptido no se deriva de la misma cadena de TCR. En otras palabras, la región de bisagra o el dominio transmembrana de la cadena α de TCR podría estar conectado al dominio transmembrana o intracelular de la cadena β de TCR y viceversa.

La presente divulgación describe además una molécula de ácido nucleico que codifica para el heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico, particularmente una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia promotora que funciona en una célula huésped de mamífero.

La presente divulgación describe además una célula, en particular una célula de mamífero, que comprende o que expresa la molécula de ácido nucleico.

5 La presente divulgación describe además una célula, en particular una célula de mamífero, más particularmente un linfocito T de mamíferos, que comprende

i. el polipéptido de receptor de antígeno quimérico según el primer aspecto de la invención, y

10 ii. una función efectora funcionalmente unida al heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico.

En ciertas realizaciones, la función efectora es:

i. una proteína indicadora, y/o

15 ii. la capacidad de inducir la muerte celular, en particular la apoptosis, en las células unidas al heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico.

En ciertas realizaciones, la proteína indicadora se selecciona de:

20 i. una proteína fluorescente,

ii. una proteína luciferasa,

25 iii. un gen de resistencia a antibióticos,

iv. una recombinasa Cre,

v. una nucleasa CAS-9, o

30 vi. un activador o supresor transcripcional quimérico de CAS-9.

La presente divulgación describe además un método para obtener una preparación de linfocitos T que tienen una reactividad reducida contra un antígeno. El método comprende:

35 i. proporcionar una preparación de linfocitos T obtenidos de un paciente,

ii. poner en contacto la preparación de linfocitos T con células de mamíferos descritas anteriormente en el presente documento,

40 en el que la célula de mamífero se caracteriza porque la función efectora es capaz de inducir la muerte celular, en particular la apoptosis, en células unidas al heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico.

45 En otras palabras, los linfocitos T específicos capaces de unirse a las secuencias de oligopéptidos proporcionadas dentro del heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico de la célula mamífero experimentarían muerte celular, en particular apoptosis.

La presente divulgación describe además un método para el agotamiento de linfocitos T que tienen una actividad contra antígenos específicos para su uso en un paciente que lo necesita. El método comprende las etapas de:

50 i. proporcionar una preparación de células de mamífero descritas anteriormente en el presente documento,

ii. administrar las células de mamífero a un paciente,

55 en el que la célula de mamífero se caracteriza por que la función efectora es capaz de inducir la muerte celular, en particular la apoptosis, de las células unidas al heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico.

60 En otras palabras, los linfocitos T capaces de unirse a la secuencia de oligopéptidos que se presenta en el heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico se agotan selectivamente. Esto puede usarse, por ejemplo, para la reducción o eliminación de linfocitos T autorreactivos en un paciente que lo necesita.

En ciertas realizaciones, este método se usa para tratar enfermedades autoinmunitarias tales como alergias. En ciertas realizaciones, este método se usa para la prevención y el tratamiento del rechazo de órganos después de un trasplante.

65 La presente divulgación describe además una célula de mamífero descrita anteriormente en el presente documento

para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplantes o disfunción inmunitaria incluyendo, pero sin limitarse a, diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn y síndrome inflamatorio del intestino. En otras palabras, la célula de mamífero se usa para el agotamiento de linfocitos T que tienen una actividad contra antígenos específicos, asociados a enfermedad.

La presente divulgación describe además un método para detectar la respuesta inmunitaria de un paciente a un oligopéptido. El método comprende las etapas de:

- i. proporcionar una célula de mamífero descrita anteriormente en el presente documento, en el que dicha célula comprende una proteína indicadora funcionalmente unida a dicho heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico,
- ii. proporcionar una muestra de sangre del paciente *ex vivo* que contiene linfocitos T implicados en la respuesta inmunitaria,
- iii. poner en contacto la célula de mamífero con la muestra de sangre en condiciones que permiten que la función efectora funcione, y
- iv. detectar la proteína indicadora en la célula de mamífero.

En otras palabras, si en la sangre de un individuo se enriquecen linfocitos T capaces de unirse al oligopéptido usado dando como resultado una fuerte expresión de proteína indicadora, esto indica una respuesta inmunitaria contra el oligopéptido.

En ciertas realizaciones, el oligopéptido usado en este método se deriva de un virus, una bacteria, un hongo o un parásito.

En algunas realizaciones, el método comprende además las etapas de

- i. separar las células de mamífero según la expresión de la proteína indicadora,
- ii. aislar el ADN de las células de mamífero separadas, y
- iii. secuenciar el oligopéptido, codificado en el heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico descrito anteriormente en el presente documento.

En otras palabras, se usa una multitud de células de mamífero con diferentes oligopéptidos en el heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico. Cada uno de estos oligopéptidos se deriva de un determinado patógeno, alérgeno, tumor o tejido inflamado (en el caso de un paciente autoinmunitario). Esto permite realizar pruebas simultáneas para una multitud de diferentes respuestas inmunitarias. Un ejemplo no limitativo es el uso como herramienta de diagnóstico.

Cuando se presentan alternativas para características individuales separables tales como, por ejemplo, una secuencia de ligador, longitud de ligador, en el presente documento como "realizaciones", debe entenderse que tales alternativas pueden combinarse libremente para formar realizaciones diferenciadas dadas a conocer en el presente documento.

La invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos y figuras, de los que pueden extraerse realizaciones y ventajas adicionales. Estos ejemplos pretenden ilustrar la invención, pero no limitar su alcance. La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Descripción corta de las figuras

La figura 1 muestra la estructura y reactividad específica de antígeno del sensor de MCR2 (heterodímero de polipéptido receptor de antígeno quimérico con partes extracelulares de CMH II). (a) Representación esquemática del MCR2 y su interacción con el TCR específico de péptido. (b) Expresión de superficie de MCR2(gp61) en células de timoma BEKO. (c) Transcurso temporal de la regulación por disminución de MCR2(gp61) (panel izquierdo) o MCR2(OVA) (panel derecho) en células BEKO cocultivadas con células T CD4+ transgénicas para TCR OT-II específicas de OVA o Smarta específicas de gp61. Los valores muestran los niveles de MCR2 representados como porcentaje de intensidad de fluorescencia media al inicio del cocultivo. (d) Transcurso temporal de activación de NFAT específica de péptido (expresión de GFP) en células H18.3.13 transducidas con MCR2(gp61) o MCR2(OVA) cocultivadas con células T CD4+ Smarta u OT-II. El histograma muestra ejemplos de mediciones de activación de NFAT en células MCR2(gp61)+ en los puntos de tiempo indicados. (e) Sensibilidad de células indicadoras específicas de péptido. Se diluyeron células H18.3.13 MCR2(gp61)+ en células H18.3.13 MCR2(OVA)+ y se midió la activación de NFAT en células no tratadas (triángulos) o después del cocultivo con células T CD4+ Smarta (cuadrados). El gráfico muestra una correlación lineal ($R > 0,99$) entre el porcentaje de células H18.3.13 GFP+ y el porcentaje de células que portan el MCR2(gp61). (f) Frecuencia mínima de células T específicas de péptido capaces de desencadenar una activación robusta de NFAT en

células indicadoras MCR2+. Se mezclaron esplenocitos de ratones transgénicos Smarta y OT-II a diferentes proporciones y se usaron para estimular células H18.3.13 MCR2(gp61)+ o MCR2(OVA)+. El gráfico muestra el porcentaje de células GFP+ entre las células H18.3.13 MCR2(gp61)+ o H18.3.13 MCR2(OVA)+ en función del porcentaje de células T CD4+ específicas de péptido, después de 8 h de cocultivo. (g) El número mínimo de células T específicas de péptido capaces de desencadenar una respuesta en células indicadoras. Activación de NFAT en células H18.3.13 MCR2(gp61)+ (izquierda) y MCR2(OVA)+ (derecha) después de cocultivo durante la noche con diferentes números de células T CD4+ Smarta u OT-II. h) Cinética de la expansión de células T CD4+ específicas de LCMV en la sangre de ratones infectados (n=3) detectada por la activación de células H18.3.13 MCR2(gp61)+. Se muestra el porcentaje de células indicadoras GFP+ después del cocultivo durante la noche con sangre tomada en diferentes días después de la infección. Se usó sangre de un ratón Smarta sin tratamiento previo como control positivo.

La figura 2 muestra el cribado de mimotopos de gp61. (a) Un esquema de aleatorización de péptidos mediada por RAG basándose en el cual se generó la biblioteca de mimotopos de MCR2(gp61-RSS) (véase Materiales y métodos), RSS, secuencia señal de recombinación. (b) Ejemplos de secuencias de gp61 alteradas encontradas en la biblioteca (los nuevos aminoácidos se muestran en gris). (c) Células 16.2c11 que portan el indicador de NFAT-FT se transdujeron con la biblioteca de MCR2(gp61-RSS) o con MCR2(OVA) o MCR2(gp61) como controles y se cocultivaron con hibridomas de células T CD4+ Smarta u OT-II. Se clasificaron y se expandieron células MCR2(gp61-RSS)+ individuales que mostraban activación de NFAT (fluorescencia de azul-FT) después del cocultivo de 9 h con el hibridoma de Smarta específico de gp61 (panel superior derecho). (d) Activación de células 16.2c11 MCR2(gp61)+, MCR2(gp61S)+ y MCR2(gp61N)+ cocultivadas con el hibridoma de Smarta. (e) Secuencias de gp61 original y dos nuevos mimotopos de gp61 encontrados en la biblioteca de MCR2(gp61-RSS). (f) Dilución de CFSE en células T CD4+ Smarta después de un cocultivo de 3 días con células dendríticas pulsadas con mimotopos de gp61 a diferentes concentraciones (histogramas) y producción de citocinas a una concentración de 100 nM (gráficos de puntos).

La figura 3 muestra la búsqueda de nuevos epítomos de LCMV. (a, b) Se purificaron células T CD4+ de ratones infectados con LCMV de los bazo 5 y 8 días p.i. y se fusionaron con células BW5147 que portaban un indicador de NFAT-GFP. La reactividad de los hibridomas resultantes se determinó mediante la expresión de GFP después del cocultivo con células dendríticas pulsadas con LCMV o gp61. Los histogramas (a) muestran ejemplos de diferentes tipos de reactividad (LCMV-blanco o gp61-gris oscuro) y la tabla (b) un resumen de los datos (c) un esquema de la estrategia de clonación para la construcción de bibliotecas enriquecidas en péptidos que se producen de manera natural (NPL). ORF - marco de lectura abierto que dicta la secuencia de proteína natural. (d) Se cocultivaron células indicadoras 16.2c11 MCR2(LCMVNPL)+ con hibridomas reactivos con LCMV (H2, H3, H14 y H30) de especificidad de péptido desconocida. Las células indicadoras activadas se clasificaron, se expandieron y se cocultivaron nuevamente con los hibridomas correspondientes. Para lograr suficiente enriquecimiento, este procedimiento se repitió tres veces. Los gráficos de puntos muestran un ejemplo de activación de NFAT después de dos o tres rondas de cocultivo. (e) Después de la tercera ronda de enriquecimiento, las células individuales se clasificaron, se expandieron y se verificó su reactividad mediante cocultivo con hibridomas (el histograma muestra la reactividad de NFAT de ejemplo). La tabla de la derecha muestra las frecuencias de clones reactivos. A continuación se muestran las secuencias peptídicas de los constructos de MCR2, que representan el epítomo dominante NP311 y el nuevo epítomo NP547.

La figura 4 muestra una prueba de función de la molécula de MCR1 (heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico con partes extracelulares de CMH I; gp33/H2-Kb) transducida en la línea celular indicadora H18.3.13. (A) Después de un cultivo durante la noche en pocillos recubiertos con anticuerpos α CMH-I, se indujo la activación de la NFAT en las células transducidas con MCR1, pero no en células de control.

La figura 5 muestra a) la activación de células 16.2c11 MCR2(LCMV-NPL)+ después de una, dos y tres rondas de enriquecimiento por cocultivo con hibridomas H3 y H4. b) Ejemplos de activación de clones de 16.2c11 MCR2+ derivados del cribado de una biblioteca de MCR2 de péptidos al azar con el hibridoma H9 después del cocultivo final. Se muestran ejemplos de secuencias recuperadas de la biblioteca antes y después del enriquecimiento en péptidos reactivos con H9.

La figura 6 muestra la reactividad específica de péptido y la sensibilidad del sensor de MCR2. a) Transcurso temporal de la activación de NFAT específica de péptido (expresión de indicador de GFP) en células H18.3.13 MCR2(OVA)+ cocultivadas con células T CD4+ OT-II o células T CD4+ Smarta como controles. El histograma muestra ejemplos de mediciones de activación de NFAT en células MCR2(OVA)+ en los puntos de tiempo indicados. b) Sensibilidad de células indicadoras específicas de péptido. Se diluyeron células H18.3.13 MCR2(OVA)+ en células H18.3.13 MCR2(gp61)+ y se midió la activación de NFAT después del cocultivo con células T CD4+ OT-II. El gráfico muestra una correlación lineal ($R > 0,99$) entre el porcentaje de células H18.3.13 GFP+ y el porcentaje de células que portan el MCR2(OVA).

Ejemplos

Ejemplo 1: Cribado de epítomos de células T en células de mamíferos usando el heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico dado a conocer

Los métodos actuales para identificar epítomos de células T relacionados se basan en principio en dos enfoques principales. El primer enfoque se basa en la detección de interacciones físicas de CMH-TCR mediante la tinción de células T con tetrámeros de CMH o tinción de fagos, levaduras o células de insectos que presentan complejos de péptido-CMH con TCR recombinantes. El segundo enfoque se basa en la medición de la activación de células T en cocultivos con células dendríticas (DC) que presentan conjuntos de péptidos o bibliotecas de péptidos combinatorias de exploración posicional. El cribado de bibliotecas de tetrámeros de CMH es eficaz para definir la especificidad fina del reconocimiento de antígenos conocidos o predichos, pero debido a que no todos los tetrámeros de péptido-CMH se unen con igual fuerza, pueden omitirse fácilmente interacciones de baja afinidad (por ejemplo, se necesitan 400 veces más tetrámeros de OVA-I-A^b que tetrámeros de gp66-I-A^b, para una tinción similar de células T OT-II específicas de OVA y células T Smarta2 específicas de gp61, respectivamente). Se aplican restricciones de afinidad similares a los métodos actuales de presentación de péptido-CMH, donde se usan TCR solubles. Además, las moléculas de CMH tienen que mutagenizarse para permitir una expresión de superficie eficaz en fagos o células de levadura. El cribado de bibliotecas de péptidos combinatorias de exploración posicional aprovecha la reactividad cruzada del TCR y utiliza conjuntos de péptidos para definir motivos que conducen a la activación de células T. Aunque se han encontrado epítomos de células T que se asemejan a péptidos que se producen de manera natural con este método, los péptidos identificados a menudo no tienen una homología clara con proteínas conocidas y es necesario recurrir a enfoques bioinformáticos.

Los inventores dan a conocer en el presente documento el desarrollo de un sistema universal que permite un cribado directo, sin sesgos, sensible y eficaz de epítomos en células de mamífero. Un método de este tipo debe: i) proporcionar una mezcla compleja de APC, presentando cada una péptidos de una única secuencia que se produce de manera natural; ii) proporcionar medios eficaces para identificar y separar las APC que presentan péptidos relacionados; iii) ofrecer la posibilidad de repetir iterativamente el procedimiento y iv) permitir una fácil recuperación de secuencias de péptidos mediante clonación. Para generar APC que satisfacen los primeros criterios, los inventores siguieron los enfoques usados para producir ratones de "péptido individual" y para construir diferentes sistemas de presentación de péptido-CMH. Por medio de la tecnología de ADN recombinante, se unió un péptido directamente a la molécula de CMH, produciendo un complejo estable y evitando que se unan otros péptidos. Una biblioteca de tales complejos de péptido-CMH transfectados en células deficientes en CMH da lugar a un conjunto de células que presentan cada una un péptido único (para más detalles véase Materiales y métodos). Idealmente, la identificación de las APC que portan péptidos relacionados para células T particulares implicaría una señal fácilmente medible una vez que a sus complejos de péptido-CMH se unieron los TCR de las células T específicas. Por tanto, la molécula de fusión de péptido-CMH estaba unida al complejo de TCR, que está hecho a medida para detectar interacciones de baja afinidad. Se han usado satisfactoriamente fusiones directas de cadena zeta (CD247) para construir diversos receptores de antígeno quimérico. Sin embargo, para crear un sensor molecular que se asemeja al complejo de TCR nativo lo máximo posible, los complejos de péptido-CMH se fusionaron con cadenas truncadas TCR α y TCR β que consistían en los dominios de región de bisagra, transmembrana (TM) e intracelular (IC). La conexión del péptido-CMH a toda la maquinaria de señalización de TCR proporciona más señales fisiológicas. Esta quimera de CMH-TCR se denomina MCR en el contexto de esta memoria descriptiva. Una molécula de este tipo, tras su transfección en hibridomas de células T deficientes en TCR, permite la monitorización directa del acoplamiento a péptido-CMH por los TCR de células T específicas usando un sistema indicador de NFAT-EGFP (figura 1a). El cocultivo de células que portan una biblioteca de moléculas de péptido-MCR con hibridomas o clones de células T específicos de antígeno permite la identificación directa de las especificidades de péptidos relacionados de las células T mediante un cribado funcional masivamente en paralelo en células de mamífero.

Por tanto, el MCR se diseñó y se clonó para el cribado de péptidos relacionados de células T restringidas por CMH de clase II, por tanto, MCR2. MCR2 consiste en dos cadenas: la cadena α , compuesta por los dominios extracelulares de la cadena α de CMH de clase II de I-A^b unida a un TCR α truncado; y la cadena β compuesta por un péptido (el epítipo derivado de LCMV dominante, gp61) y los dominios extracelulares de la cadena β de CMH de clase II de I-A^b unida a un TCR β truncado (figura 1a). También se clonó un segundo MCR2 que portaba el péptido OVA y los dos se designaron MCR2(gp61) y MCR2(OVA), respectivamente. Tras la transducción de los MCR en una línea celular de timoma CMH-II-TCR⁺ BEKO, su expresión se verificó mediante tinción con anticuerpos anti-CMH-II. Tal como se representa en la figura 1b, el MCR2 se expresó eficientemente en la superficie celular, lo que indica que se ensambló con componentes de CD3 del complejo de TCR. Para verificar su especificidad, se cocultivaron células BEKO que expresaban MCR2(gp61) o MCR2(OVA) con células T CD4⁺ Smarta2 u OT-II. Se observó una regulación por disminución de MCR2 muy rápida y específica de péptido desde la superficie, con cinética idéntica a los TCR convencionales. MCR2(gp61) se reguló por disminución en cocultivos con células T Smarta2 y no en presencia de células T OT-II (figura 1c, panel izquierdo). Lo contrario era cierto para el MCR2(OVA), resaltando la especificidad del sistema de MCR2 (figura 1c, panel derecho). Además, se evaluó la capacidad del MCR2 para desencadenar la activación de NFAT transduciéndolo en un hibridoma de células T deficiente en TCR que portaba el indicador de NFAT-EGFP (H18.3.13). De nuevo, la respuesta de NFAT solo se desencadenó cuando se cocultivaron hibridomas que portaban MCR2 con células T específicas de péptido (figura 1d). La respuesta fue robusta y fácilmente medible ya después de 2 h (figura 1d, panel más a la derecha).

Los inventores sometieron a prueba la sensibilidad del sistema de MCR mezclando células indicadoras MCR2(gp61)⁺ y MCR2(OVA)⁺ a diferentes proporciones y midiendo la activación de NFAT después del cocultivo con células T CD4⁺

Smarta2 u OT-II. Tal como se muestra en la figura 1e, fue posible detectar directamente la expresión específica de indicador de NFAT en células presentes a frecuencias por encima de 1/10000. De manera importante, se observó una correlación lineal entre el porcentaje de células que expresan NFAT-EGFP detectadas y el porcentaje de células que portan el MCR2 "específico de idiotype/célula T", lo que indica que células específicas presentes a frecuencias inferiores a 1/10000 son todavía NFAT-EGFP⁺, incluso si no pueden distinguirse del fondo. También se determinó la frecuencia más baja de células T específicas de péptido en una población heterogénea, que era capaz de desencadenar una activación robusta de NFAT en células MCR2⁺. Se mezclaron células T CD4⁺ clasificadas (figura 1f, panel superior) o esplenocitos sin clasificar (figura 1f, panel inferior) de ratones Smarta2 y OT-II a diferentes proporciones y se usaron para estimular células MCR2(gp61)⁺ o MCR2(OVA)⁺. Incluso con solo un 1 % de células T CD4⁺ específicas de péptido, se desencadenó un 50 % de la activación máxima de NFAT en células MCR2⁺, cuando se proporcionaron células T en exceso. De manera notable, tal como se muestra en la figura 1g (panel izquierdo), incluso una sola célula T CD4⁺ Smarta2 fue capaz de desencadenar una activación significativa de NFAT-EGFP en células MCR2(gp61)⁺, mientras que en el caso de las células MCR2(OVA)⁺, se requirieron 5 células, probablemente debido a una menor afinidad de interacción (figura 1g, panel derecho). Estos resultados indican que puede usarse la tecnología de MCR como herramienta de diagnóstico sensible para la monitorización de especificidades de células T en la sangre tomada de los pacientes. De hecho, pueden usarse células indicadoras MCR2(gp61)⁺ para rastrear eficazmente la expansión de células T CD4⁺ específicas de antígeno en la sangre de animales infectados por LCMV (figura 1h). Estos resultados demuestran la gran sensibilidad del método de MCR.

Para usar la invención dada a conocer para encontrar péptidos específicos poco comunes en una biblioteca compleja, se necesitan múltiples ciclos iterativos de cocultivo y clasificación de células indicadoras NFAT-EGFP⁺. Debido a que la detección eficaz de activación de NFAT en rondas posteriores de estimulación depende de la rápida desaparición de las señales de indicador de NFAT desencadenadas en rondas anteriores, se reemplazó el EGFP muy estable por el temporizador fluorescente lento (sFT). Este mutante de mCherry cambia de "color" con el tiempo, permitiendo la distinción de activación reciente (azul-mCherry) y pasada (rojo-mCherry) de NFAT y por tanto permite intervalos mucho más cortos entre rondas posteriores de estimulación.

En primer lugar, se aplicó la invención dada a conocer para la búsqueda de mimotopos de gp61 en la biblioteca de MCR2(GP61-RSS), generada mediante la aleatorización de residuos centrales de gp61 a través de reordenamiento mediado por RAG (figura 2a y M&M). Los clones seleccionados aleatoriamente contenían constantemente mutantes únicos de la secuencia de gp61 (figura 2a). Después de transducir esta biblioteca en células indicadoras de NFAT-sFT (16.2c11), las células MCR2⁺ se clasificaron, se expandieron y se cocultivaron con hibridomas de células T específicas de gp61 o específicas de OVA (figura 2b). Alrededor del 10 % de las células 16.2c11 MCR2(gp61-RSS/-A^b)⁺ mostraron activación de indicador de NFAT azul cuando se cocultivaron con hibridomas específicos de gp61. Estas células se clasificaron como células individuales, se expandieron y volvieron a cribarse (figura 2c). Todos los 24 clones sometidos a prueba respondieron a la reestimulación con hibridomas específicos de gp61. La amplificación por PCR y secuenciación de las partes peptídicas de los MCR de estos clones revelaron dos nuevos mimotopos y el péptido gp61 original (figura 2c). La lisina en la posición 9 de gp61 se mutó a serina (gp61S) o a asparagina (gp61N), lo que indica que no se requiere absolutamente para la activación de células T Smarta2. Sin embargo, el nivel de activación de NFAT sugirió que TCR Smarta2 se une a los nuevos mimotopos (en particular gp61S) con menor afinidad (histograma en la figura 2c). En cocultivos de células T con células dendríticas, ambos mimotopos indujeron respuestas robustas de células T Smarta2. De manera interesante, mientras que gp61N indujo proliferación y producción de citocinas de tipo Th1 de manera similar al péptido original, el gp61S subóptimo fue mucho menos eficaz en la impulsión de la proliferación, pero indujo una fuerte respuesta de citocinas de tipo Th2 (figura 2d).

Finalmente, se realizó un cribado para epítomos de LCMV novedosos con la ayuda de hibridomas de células T CD4⁺ derivados de animales infectados por LCMV 5 y 8 días después de la infección (figura 3a y b). Los hibridomas portaban un indicador de NFAT-EGFP que permitió verificar su reactividad contra LCMV y recoger hibridomas no reactivos con gp61 para su análisis adicional (figura 3b). Cinco de tales hibridomas (H30, H14, H2 que responden fuertemente y H4, H3 que responden débilmente) se usaron para cribar células indicadoras 16.2c11 transducidas con una biblioteca de moléculas de MCR2 que portaban todos los péptidos solapantes posibles de la glicoproteína (GP) y la proteína nuclear (NP) de LCMV. Esta "biblioteca de péptidos genuinos" (GPL) se generó clonando piezas aleatorias de ADNc que codifica para GP y NP en el vector de MCR2 (figura 3c) y tiene una ventaja significativa con respecto a bibliotecas de péptidos aleatorias o combinatorias, ya que muchos (1/6) de los péptidos recuperados representan proteínas nativas. De hecho, para 4 de cada 5 hibridomas, se identificaron directamente péptidos diana específicos de LCMV. Tres de los hibridomas (H30, H14 y H2) reconocieron un epítipo dominante de LCMV conocido NP311 y H3 reaccionó con un nuevo epítipo NP547 (figura 3d). El quinto hibridoma (H4) no dio lugar a ningún enriquecimiento para las células indicadoras reactivas, incluso después de 3 rondas iterativas de cribado. La expresión de superficie de TCR se sometió a prueba en este hibridoma y se encontró que era negativa para TCR. El TCR probablemente se perdió durante la expansión después del cribado inicial de especificidad de LCMV. Este resultado verifica además la especificidad de TCR del método dado a conocer. Se usó un hibridoma adicional (H9) para cribar una biblioteca de MCR2 que portaba péptidos al azar y se encontraron varios epítomos fuertemente reactivos, pero no se asemejaban a ningún péptido de LCMV. Este apoya además la estrategia de usar GPL en lugar de bibliotecas de péptidos al azar para el cribado de epítomos de células T.

En el presente documento, se da a conocer un nuevo sensor molecular, que permite la detección de interacciones de

péptido-CMH-TCR en el lado de APC con gran especificidad, sensibilidad y cinética rápida. Utilizando este indicador, se estableció un enfoque novedoso para el cribado funcional y sin sesgos de epítomos de células T. Combina la versatilidad de la clonación por expresión con las capacidades de sensibilidad y alto rendimiento de la clasificación celular activada por fluorescencia y permite un cribado iterativo eficaz de bibliotecas de péptidos en células de mamíferos. Todo esto proporciona ventajas significativas con respecto a los métodos conocidos en la técnica. En primer lugar, gracias a la interacción multivalente entre los MCR y los TCR, la unión de alta y baja afinidad genera señales de NFAT-indicador similares (figura 1d) y, por tanto, es menos probable que se pierdan ligandos de baja afinidad. De hecho, a pesar de que los epítomos de LCMV se han estudiado ampliamente, pudo identificarse un epítomo novedoso, NP547. En segundo lugar, nos e requiere modificación por ingeniería genética de TCR recombinantes individuales o mutagénesis del CMH, ya que los péptidos se criban en el contexto de moléculas nativas de TCR y CMH expresadas en la superficie de células de mamífero. En tercer lugar, tal como se ejemplifica mediante el cribado de péptidos del virus LCMV, la tecnología de MCR facilita el cribado eficaz de bibliotecas altamente enriquecidas en péptidos derivados del patógeno/célula/tejido seleccionado como diana por la célula T de interés.

El enfoque basado en MCR proporciona un modo versátil, fácil de usar y potente para identificar especificidades antigénicas de células T. Como tal, puede tener un impacto en varios campos de la investigación básica y clínica. Definir las especificidades de las células T infiltrantes en tumores reguladoras y efectoras permite el descubrimiento de antígenos tumorales novedosos. La definición de las especificidades de células T infiltrantes en tejidos autorreactivos ayuda en el desarrollo de terapias específicas de antígeno para enfermedades autoinmunitarias. En este sentido, MCR también puede permitir un redireccionamiento eficaz de las funciones efectoras de células T hacia células T específicas de péptido, permitiendo la purga del repertorio de especificidades no deseadas. Además, el cribado de bibliotecas de mimotopos conducirá al descubrimiento de variantes de péptidos de alta afinidad y al desarrollo de pruebas basadas en citometría de flujo sensibles para la reactividad antigénica de células T que circulan en la sangre de los pacientes.

Materiales y métodos

Ratones

Se adquirieron ratones C57/Bl6 de Charles River. Se criaron ratones Smarta2 y OT-II en la instalación de ratones de ETH.

Líneas celulares

Beko es una línea celular de timoma espontánea derivada de ratones deficientes en TCR β . La línea celular indicadora H18.3.13 se generó transduciendo retroviralmente el indicador de NFAT-EGFP (que porta cuatro copias del promotor mínimo humano de IL-2, conteniendo cada una 3 sitios de unión a NFAT ACGCCTTCTGTATGAAACAGTTTTCTCC (SEQ ID NO 001), insertados en el sentido de 5' de la secuencia codificante de EGFP) en un hibridoma de células T TCR β B6. La línea celular indicadora 16.2c11 se generó transfectando el hibridoma de células T 16.2 con el constructo indicador de NFAT-sFT y un vector que codifica para el receptor de retrovirus ecotrópico murino Slc7a1.

Generación de hibridomas

Se activaron células T o timocitos clasificados con anticuerpos anti-CD3 ϵ y anti-CD28 unidos a plástico en presencia de IL-2 de ratón durante 2-3 días. Se fusionaron iguales números de células T activadas y la pareja de fusión TCR α β BW5147 usando PEG-1500, y se sembraron en placa a dilución limitante en presencia de hipoxantina 100 mM, aminopterina 400 nM y timidina 16 mM (HAT).

Clonación del MCR2

Se clonaron las cadenas α y β de MCR2 mediante técnicas convencionales y contienen las siguientes partes:

Cadena α de MCR2: los residuos de la cadena α de CMH-II I-A^b 1-208 unidos a los residuos de la región constante de la cadena de TCR α 87-137 mediante el ligador GSGGSAQ (SEQ ID NO 002).

Cadena β de MCR2: los residuos de la cadena β de CMH-II I-A^b 1-217 unidos a los residuos de la región constante de la cadena de TCR β (C1) 123-173 mediante el ligador AQSGGSGGSAQ (SEQ ID NO 003). En MCR2(gp61), los residuos DS en las posiciones 29 y 30 de la parte de CMH-II se reemplazaron por la secuencia de aminoácidos SGLNGPDIYKGVYQFKSVGSGGSGGSGDS (SEQ ID NO 004; que contenía el péptido gp61). En MCR2(OVA), los mismos residuos se reemplazaron por la secuencia de aminoácidos SISQAVHAAHAEINEAGRGSGGSGGSGDS (SEQ ID NO 005; que contenía el péptido OVA).

Transducción retroviral de líneas celulares indicadoras y timocitos clasificados

Se clonaron MCR α y MCR β en el vector retroviral pMYiresGFP, de modo que MCR β reemplazó a GFP. A lo largo del

estudio se usó este vector (pMY-MCR α iresMCR β) para generar MCR que contenían diversos péptidos y se denominaron MCR ("péptido"/haplotipo de CMH"). Se produjeron sobrenadantes que contenían retrovirus en la línea celular de empaquetamiento ecotrópica Phoenix y se usaron para infectar líneas celulares indicadoras y células clasificadas.

Generación mediada por RAG de bibliotecas de mimotopos

Para generar la biblioteca de mimotopos de gp61, se construyó el constructo MCR2(gp61-RSS-EGFP-RSS/I-A^b) insertando un fragmento de relleno que contenía EGFP y las secuencias de señal de recombinación RAG (RSS) en el medio del péptido gp61 en el constructo MCR2(gp61) (figura 2a). Este constructo se transdujo en timocitos doblemente negativos para CD4⁺CD8⁺ (DN) clasificados cultivados en Tst-4/DLL1³². Después de una semana de cultivo (durante la cual las células DN se desarrollan en células doblemente positivas para CD4⁺CD8⁺ (DP) y recombina sus genes de TCR, así como el relleno de RSS-EGFP-RSS, por reordenamiento mediado por RAG), se clasificaron las células que expresaban niveles bajos de EGFP y se preparó ADNc. La parte que codifica para péptidos del constructo MCR2(gp61-RSS-EGFP-RSS/I-A^b) recombinado se amplificó por PCR a partir del ADNc y se clonó en el vector vacío MCR2(I-A^b), generando la biblioteca de mimotopos de MCR2(gp61-RSS/I-A^b).

Generación y cribado de bibliotecas de péptidos genuinos y al azar

Para generar la biblioteca de péptidos solapantes genuinos de MCR2-LCMV, se digirió ADN que codifica para las proteínas GP y NP durante un tiempo limitado (kit de fragmentación de ADN de Takara). Los fragmentos se ligaron con ligadores homólogos a secuencias de vector que flanquean el sitio de clonación, se amplificaron por PCR, se clonaron en el vector pMY-MCR2 mediante ensamblaje de Gibson y se transfectaron en bacterias generando más de 2*10⁶ clones. Se transdujeron células 16.2c11 con esta biblioteca y se clasificaron 0,5*10⁶ células MCR^{bajo} y 2,2*10⁴ MCR^{alto}.

La biblioteca de péptidos al azar de MCR2 se preparó mediante la clonación de un oligonucleótido (GGTNNNNNTWCNNNNNNBCCNNNSCCNNNNNNKCCNNNGGA) (SEQ ID NO 006) en el vector de MCR2 usando la estrategia descrita anteriormente. Este oligonucleótido codificó para aminoácidos al azar en posiciones enfrentadas al TCR, mientras que los residuos de anclaje se fijaron parcialmente para garantizar una buena presentación. La complejidad fue de 5,5*10⁶ clones bacterianos y después de la transducción se clasificaron 11,5*10⁶ células MCR2+ individuales.

Ensayo de regulación por disminución de MCR

Si no se indica lo contrario, se cocultivaron células B6ko MCR2⁺ con un exceso de 5 veces de células T CD4⁺ clasificadas de ratones donantes indicados.

Estimulación de células H18.3.13 o 16.2c11 MCR⁺

Si no se indica lo contrario, se cocultivaron células MCR2⁺ con un exceso de 5 veces de células T CD4⁺ clasificadas o híbridomas de células T CD4⁺ de ratones donantes indicados durante 8-12 h.

Ejemplo 2: Heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico

Primer polipéptido, cadena alfa (SEQ ID NO 007):

MPRSRALILGVLALTMTLSLCCGEDDIEADHVGTYGISVYQSPGDIGQYTFEFDGDEL FYVDLDKKET
VWMLPEFGQLASFDPQGLQNI AVVKHNLGVLT KRSNSTPATNEAPQATVFPKSPVLLGQPNTLICFV
DNIFFPPVINITWLRNSKSVADGVYETSFVNRDYSFHKLSYLTFI PSDDDIYDCKVEHWGLEEPVLKH
WEPEGSGSGSAOSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFONLSVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

Los aminoácidos 1-208 se derivan de CMH2 alfa. Los aminoácidos 209-216 son una secuencia de ligador. Los aminoácidos 217-267 se derivan de TCR alfa.

Segundo polipéptido, cadena beta (SEQ ID NO 008):

MALQIPSLLLSAAVVVLMVLSSPRTEGGSGSGSGSGDSEHFVYQFMGECYFTNGTQRIRYVTRYIYN
REEYVRYDSVGEHRAVTELGRPDAEYWSQPEILERTRAELDTVCRHNYEGPETHSLRRLEQPNVV

ISLSRTEALNHHNTLVCSVTDFYPAKIKVRWFRNGQEETVGVSSSTQLIRNGDWTFFQVLVMLEMTPRRG
 EVYTCHVEHPSLKSPITVEWRAQSGGSGGSAQGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVL
 VSTLVVMAMVKRKNS

5 Los aminoácidos 1 al 26 son un péptido líder. Entre los aminoácidos 27 y 28 se encuentra el sitio de inserción de oligopéptidos que van a presentarse. Los aminoácidos 29 a 36 son una secuencia de ligador. Los aminoácidos 37 a 228 se derivan de CMH2 beta. Los aminoácidos 229 a 236 son una secuencia de ligador. Los aminoácidos 237 a 287 se derivan de TCRBeta.

Los péptidos que van a insertarse en SEQ ID NO 008 entre los aminoácidos 27 y 28 (GG):

10 Gp61 (SEQ ID NO 009):

LNGPDIYKGVYQFKSV

15 OVA (SEQ ID NO 010):

ISQAVHAAHAEINEAGR

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para la identificación de una secuencia peptídica reconocible por TCR, que comprende:

i. poner en contacto una pluralidad de células de mamífero, en el que

- cada una de dicha pluralidad de células de mamífero expresa a un miembro de una biblioteca;

- cada miembro de dicha biblioteca codifica para un receptor de antígeno transgénico;

- dicho receptor de antígeno transgénico comprende:

• un dominio extracelular de CMH1 o CMH2,

• un oligopéptido comprendido dentro de dicho dominio extracelular, en el que el oligopéptido es diferente para cada miembro de la biblioteca, y en el que el oligopéptido se presenta de un modo adecuado para el reconocimiento por un receptor de células T,

• un dominio transmembrana de un receptor de células T (TCR), y

• un dominio intracelular de un TCR;

- dicho receptor de antígeno transgénico está funcionalmente unido a un gen indicador que codifica para una proteína indicadora, mediante lo cual la unión de un receptor de células T relacionado a dicho receptor de antígeno transgénico da como resultado la activación de dicho gen indicador,

con una preparación de linfocitos T,

ii. separar células que muestran una proteína indicadora detectable de dicha pluralidad de células de mamífero según el nivel detectable de dicha proteína indicadora, dando lugar a células activadas,

iii. aislar el ADN de dichas células activadas, y

iv. secuenciar el ADN aislado que codifica para dicha secuencia de oligopéptido comprendida en dicho receptor de antígeno transgénico.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa (ii) se realiza al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces.

3. Método *in vitro* para la identificación de una secuencia peptídica reconocible por TCR, que comprende:

i. poner en contacto una célula de mamífero, en el que

- dicha célula de mamífero expresa un receptor de antígeno transgénico;

- dicha molécula de receptor de antígeno transgénico comprende

• un dominio extracelular de CMH1 o CMH2 que comprende un oligopéptido presentado de un modo adecuado para el reconocimiento por un receptor de células T,

• un dominio transmembrana de un receptor de células T (TCR), y

• un dominio intracelular de un TCR,

- dicho receptor de antígeno transgénico está funcionalmente unido a un gen indicador que codifica para una proteína indicadora, mediante lo cual la unión de un receptor de células T relacionado a dicho receptor de antígeno transgénico da como resultado la activación de dicho gen indicador,

con una preparación de linfocitos T, activando de ese modo dicho gen indicador dando lugar a una célula de mamífero activada,

ii. aislar el ADN de dicha célula de mamífero activada, y

iii. secuenciar el ADN aislado que codifica para dicha secuencia de oligopéptido comprendida en dicho receptor de antígeno quimérico transgénico.

4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho receptor de antígeno transgénico es un heterodímero de polipéptido de receptor de antígeno quimérico que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en el que
 - 5 a. dicho primer polipéptido comprende una parte extracelular de la cadena alfa del complejo mayor de histocompatibilidad I (CMH de clase I) y dicho segundo polipéptido comprende un dominio de β 2-microglobulina, o
 - 10 b. dicho primer polipéptido comprende una parte extracelular de la cadena alfa del complejo mayor de histocompatibilidad II (CMH de clase II) y dicho segundo polipéptido comprende una parte extracelular de la cadena beta del complejo mayor de histocompatibilidad II (CMH de clase II),
en el que al menos una de dicha primera y dicha segunda cadena de polipéptido comprende adicionalmente un oligopéptido, covalentemente unido a dicho dominio de CMH extracelular;
 - 15 uno de dicho primer polipéptido y dicho segundo polipéptido comprende además una región de bisagra, un dominio transmembrana y un dominio intracelular o cola intracelular de la cadena alfa del receptor de células T y el otro de dicho primer polipéptido y dicho segundo polipéptido comprende una región de bisagra, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de la cadena beta del receptor de células T.
- 20 5. Método según la reivindicación 4, en el que el primer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos $\geq 80\%$, 85% , 90% , 92% , 94% , 95% , 96% , 97% , 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO 007 y en el que el segundo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos $\geq 80\%$, 85% , 90% , 92% , 94% , 95% , 96% , 97% , 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO 008.
- 25 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el oligopéptido tiene una longitud de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o 40 aminoácidos.
- 30 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el oligopéptido comprende un ligador.
8. Método según la reivindicación 7, en el que el ligador tiene una longitud de 4 a 16 aminoácidos y/o en el que el ligador comprende glicina y una de serina, treonina y alanina
- 35 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que se inserta el oligopéptido y una secuencia de ligador después de los aminoácidos 1, 2, 3, 4 o 5 de la secuencia de dominio α 1 o la secuencia de dominio β 1 de CMH.
- 40 10. Método según la reivindicación 5, en el que el oligopéptido se inserta entre los residuos de aminoácido 27 y 28 del receptor de antígeno transgénico como se define en SEQ ID NO:8.
- 45 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el gen indicador se selecciona de:
 - a. un gen que codifica para una proteína fluorescente;
 - 50 b. un gen que codifica para una proteína luciferasa;
 - c. un gen de resistencia a antibióticos;
 - d. un gen que codifica para una recombinasa Cre;
 - e. un gen que codifica para una nucleasa CAS-9; o
 - f. un gen que codifica para un activador o supresor transcripcional quimérico de CAS-9.
- 55 12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el gen indicador está bajo control de un elemento de respuesta NFAT.
- 60 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la célula de mamífero es una célula deficiente en CMH.
14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la preparación de linfocitos T es una preparación de células T infiltrantes en tumores o una preparación de células T infiltrantes en tejidos autorreactivos.
- 65 15. Método según la reivindicación 14, en el que la preparación de linfocitos T se ha obtenido de un paciente.

Fig. 1

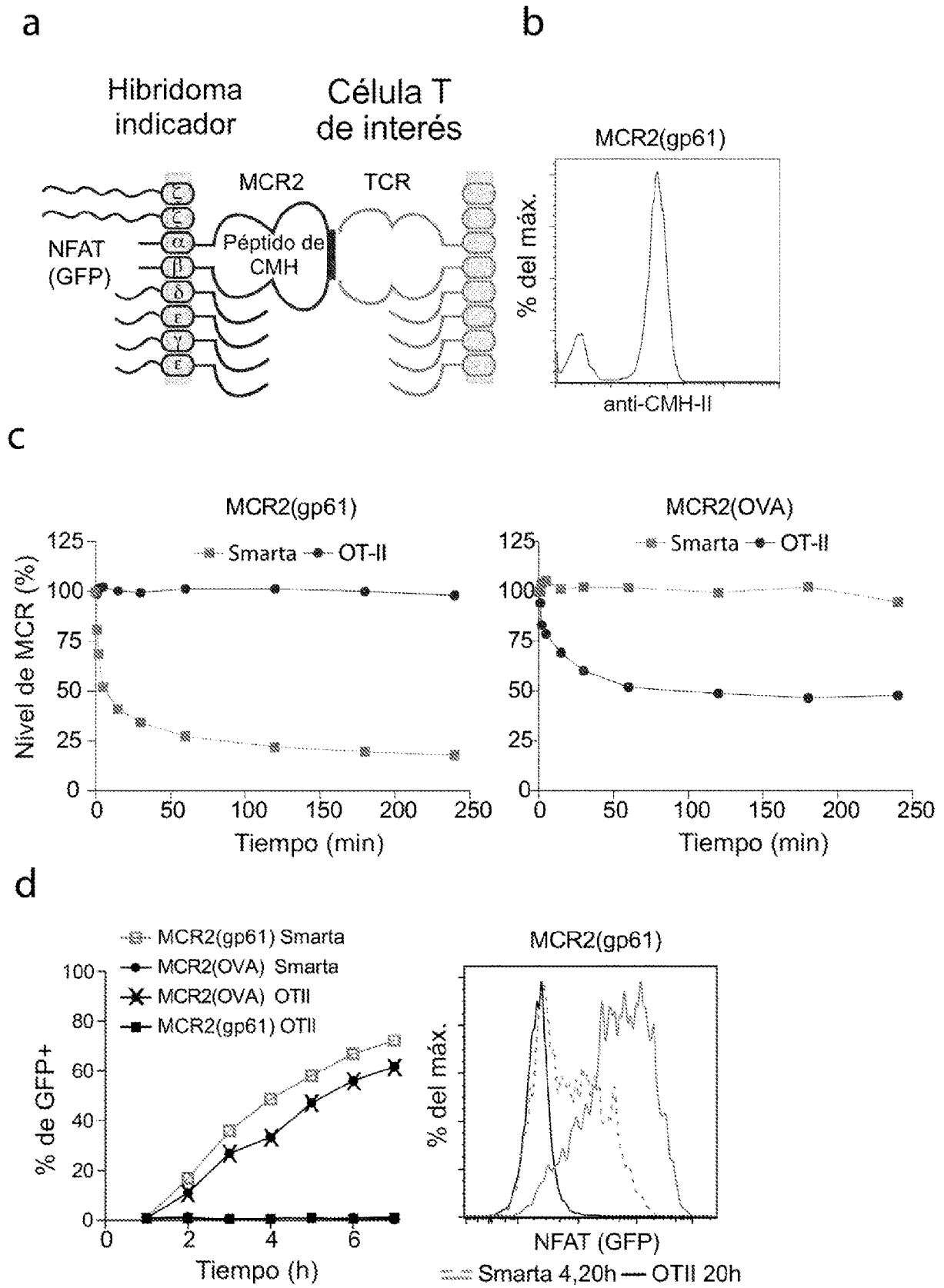


Fig. 1 continuación

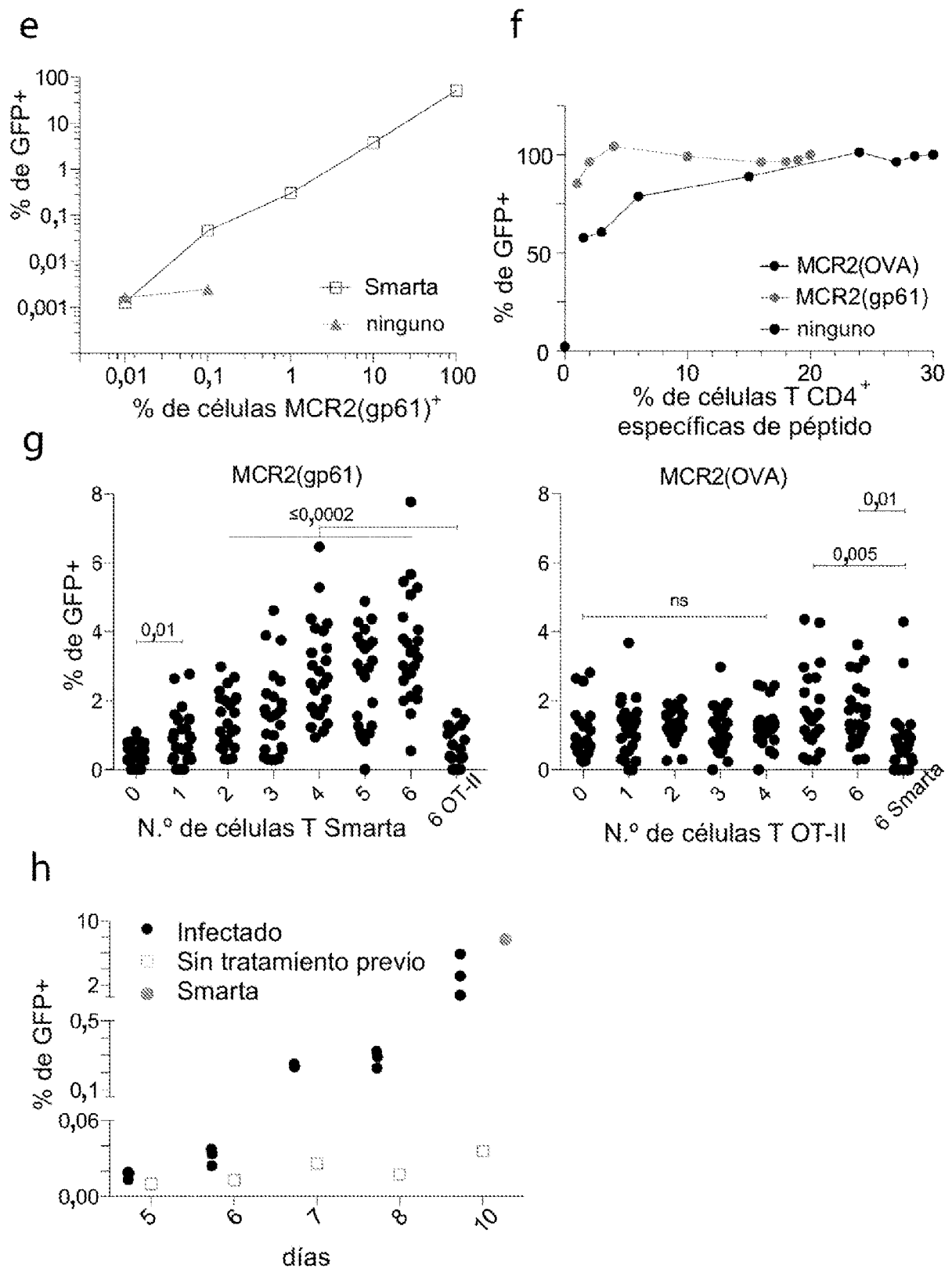


Fig. 2

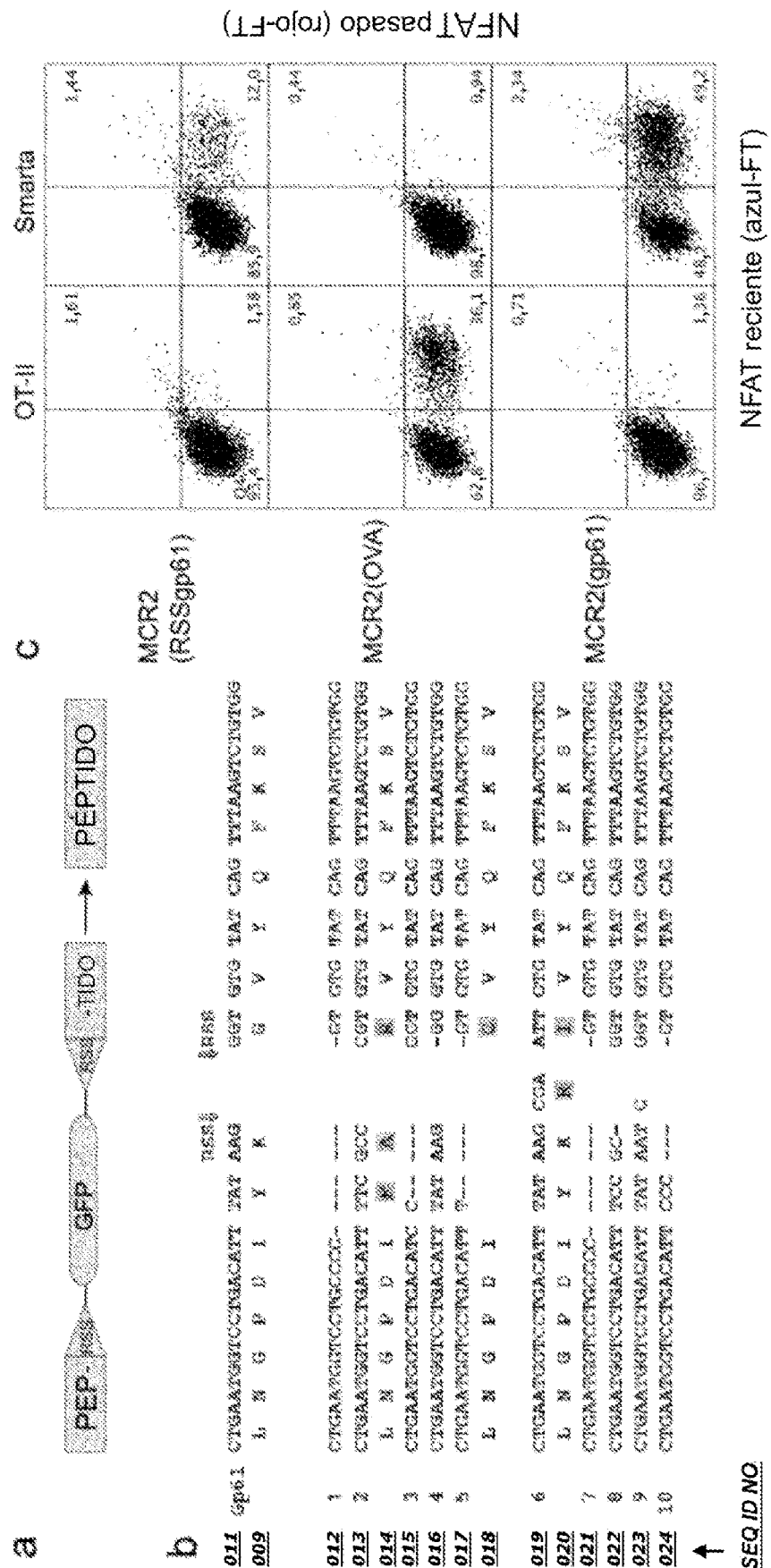


Fig. 2 continuación

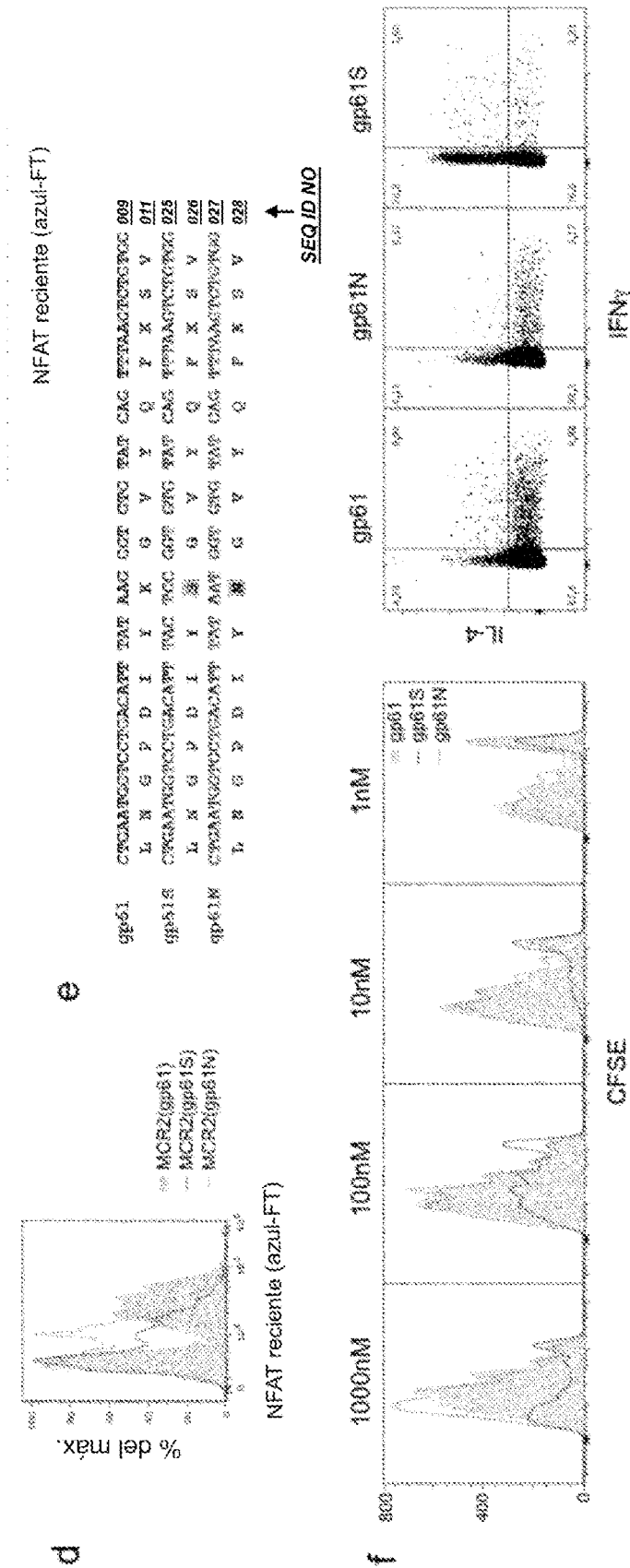


Fig. 3

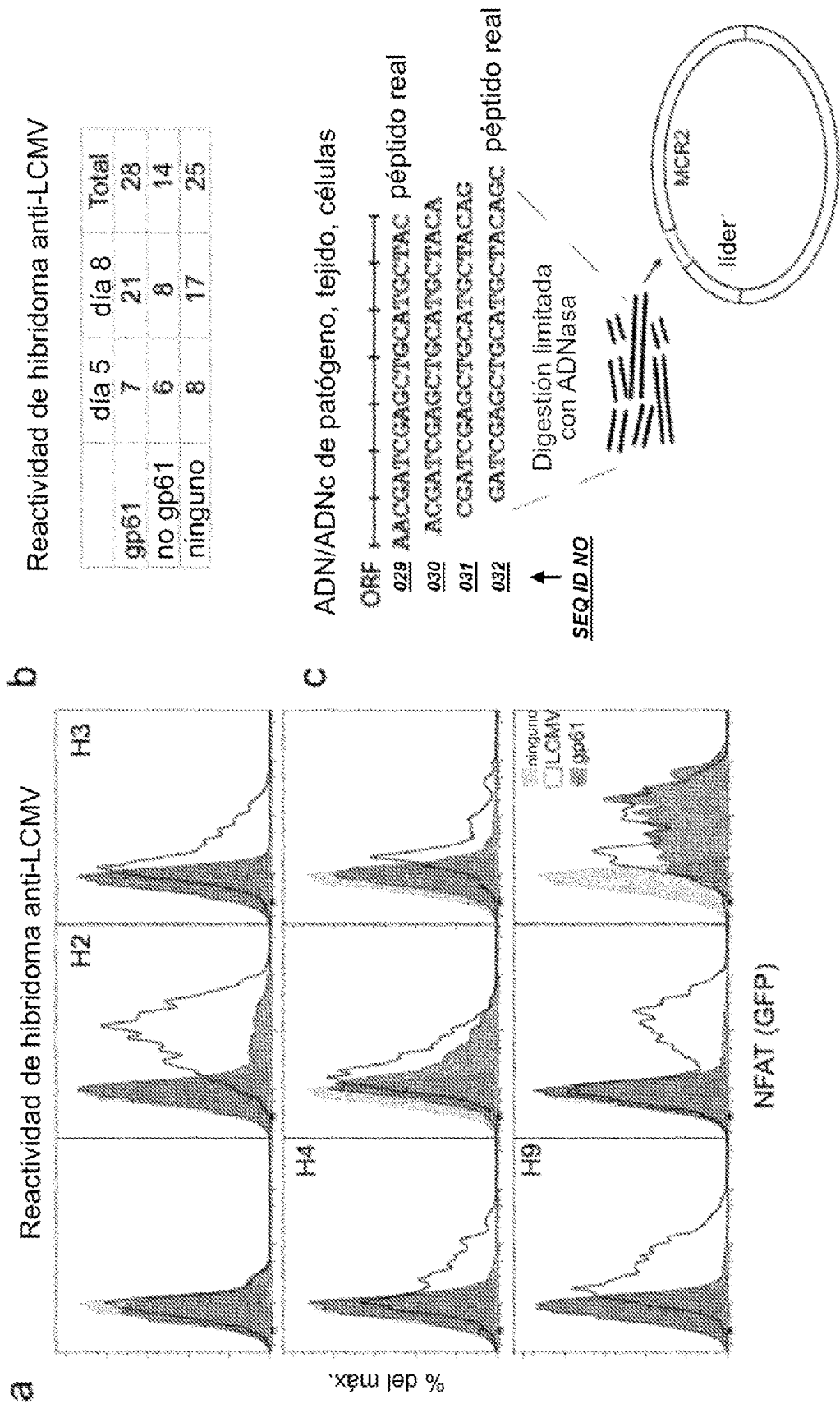


Fig. 3 continuación

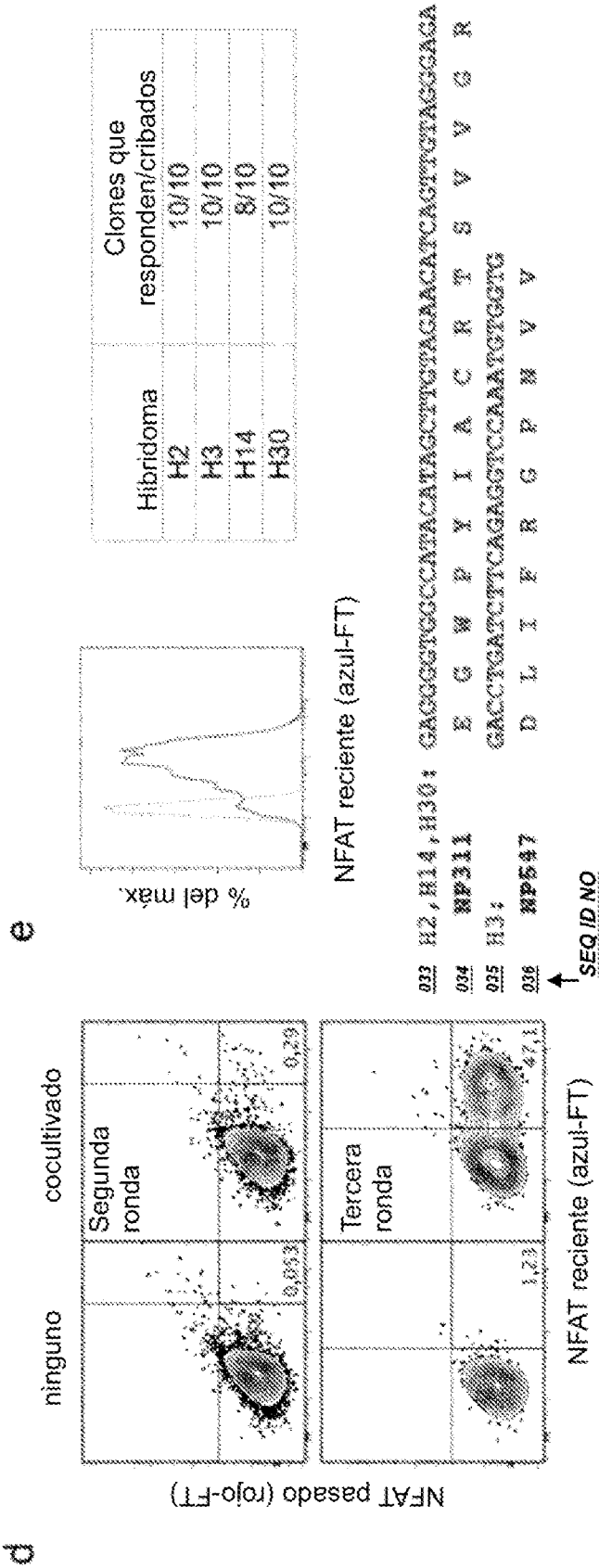


Fig. 4

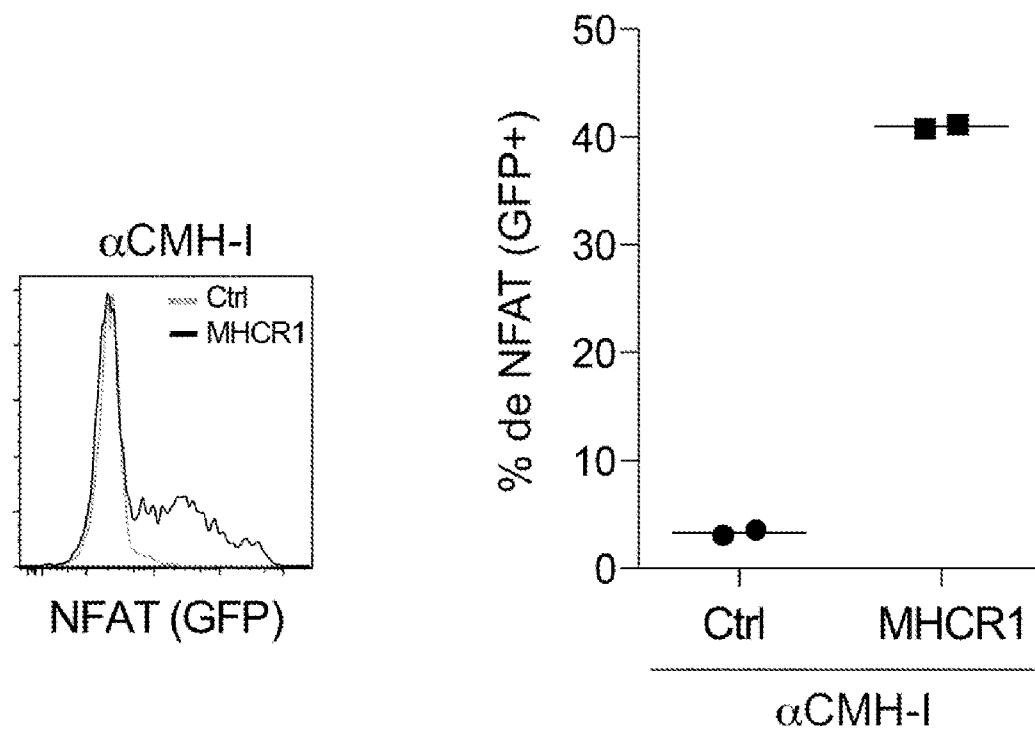


Fig. 5

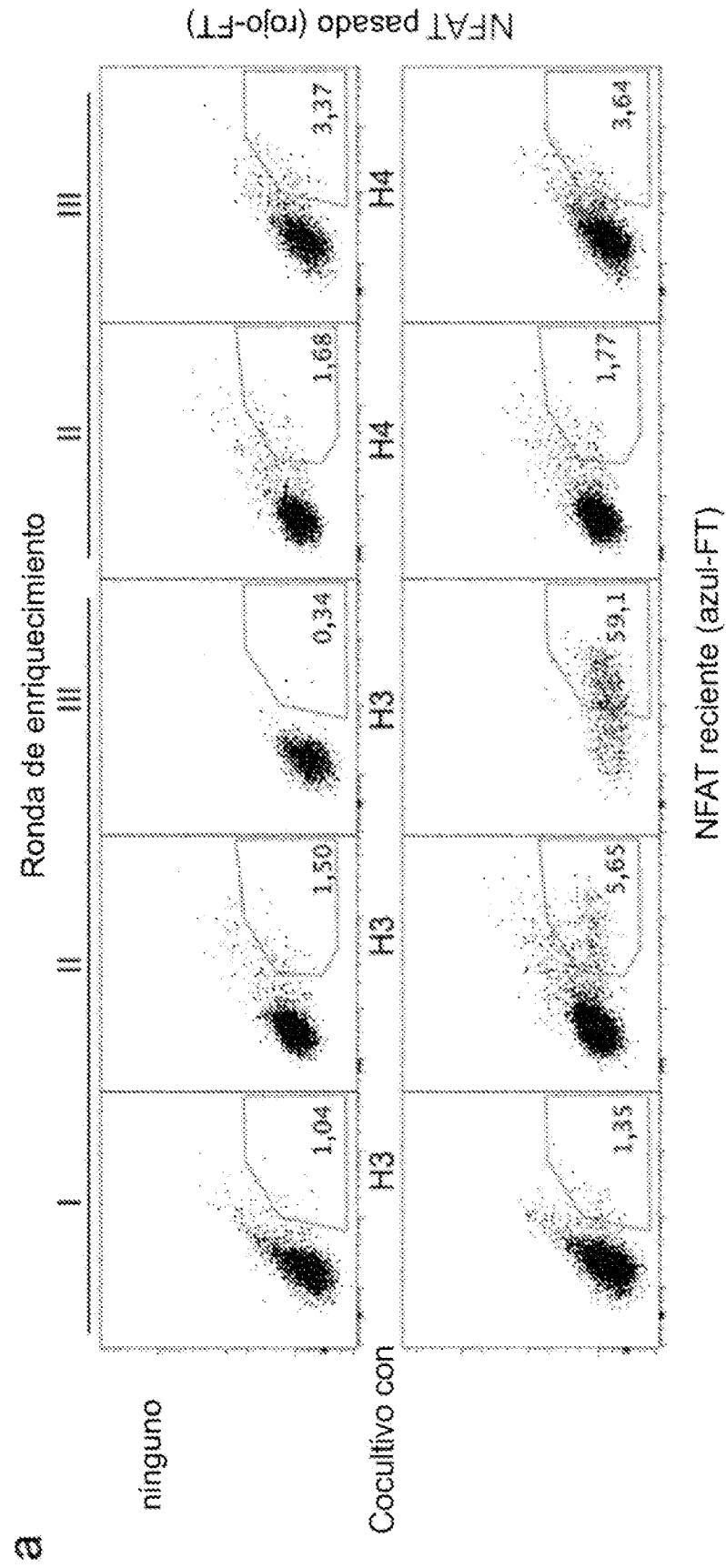


Fig. 5 continuación

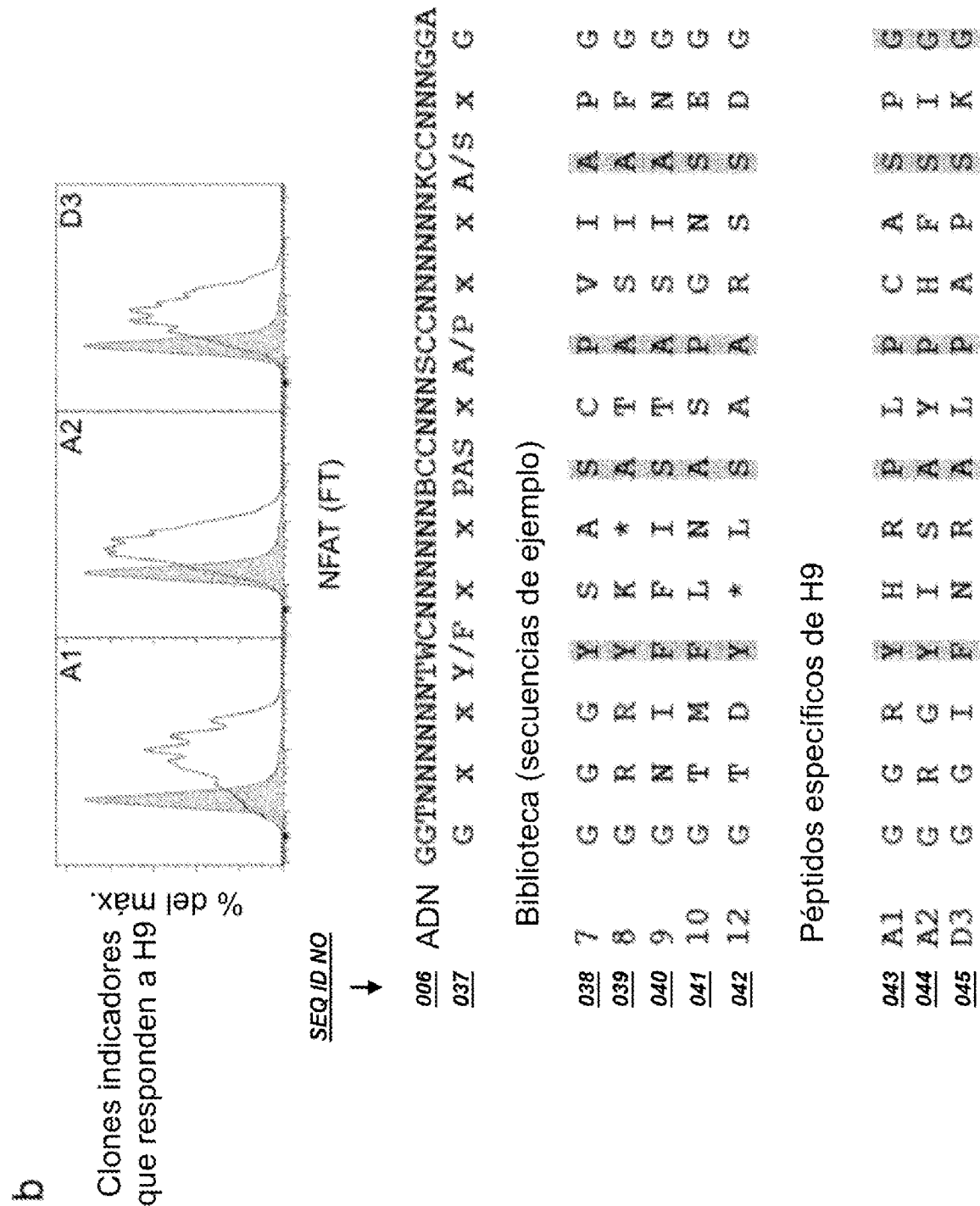


Fig. 6

