



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 272 611**

51 Int. Cl.:

C12N 5/08 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02014141 .2**

86 Fecha de presentación : **18.02.1993**

87 Número de publicación de la solicitud: **1249490**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2002**

54 Título: **Activación *in vitro* de células T citotóxicas.**

30 Prioridad: **19.02.1992 US 841662**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

73 Titular/es: **THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE**
10666 North Torrey Pines Road
La Jolla, California 92037, US

72 Inventor/es: **Peterson, Per A.;**
Jackson, Michael y
Langlade-Demoyen, Pierre

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 272 611 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

Activación *in vitro* de células T citotóxicas.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a procedimientos para activar células CD8 *in vitro* con especificidad para determinados péptidos antigénicos, el uso *in vivo* de células CD8 activadas para el tratamiento de una diversidad de condiciones morbosas, y composiciones apropiadas para estos usos.

10 **Antecedentes**

La eficiencia con la que el sistema inmune cura o protege los individuos de las enfermedades infecciosas ha intriga-
do siempre a los científicos, ya que se ha creído que podía ser posible activar el sistema inmune para combatir otros
tipos de enfermedades. Tales enfermedades incluyen el cáncer, el SIDA, la hepatitis, y enfermedades infecciosas en
pacientes inmunodeprimidos. Mientras que varios procedimientos que implican el uso de anticuerpos han sido aplica-
dos en esos tipos de enfermedades, pocos intentos exitosos, si alguno, usando células T citotóxicas han sido descritos.
Teóricamente, las células T citotóxicas serían los medios preferidos para tratar los tipos de células mencionados más
arriba. No obstante, no ha habido disponible ningún procedimiento *in vitro* para activar específicamente las células T
citotóxicas.

Las células T citotóxicas, o células CD8 como son actualmente conocidas, representan la principal línea de defensa
contra las infecciones virales. Los linfocitos CD8 reconocen y matan específicamente células que han sido infectadas
por un virus. Por tanto, el coste de eliminar una infección viral es la pérdida simultánea de las células infectadas. Los
receptor de la célula T sobre la superficie de las células CD8 no pueden reconocer antígeno extraños directamente.
Contrariamente a los anticuerpos, el antígeno debe ser presentado primero a los receptores.

La presentación del antígeno a las células B se consigue mediante las moléculas del tipo Clase I del complejo de
histocompatibilidad principal (MHC). El complejo de histocompatibilidad principal (MHC) se refiere a un gran locus
genético que codifica una familia extensa de glicoproteínas que juegan un rol importante en la respuesta inmune. Los
genes del MHYC, el cual se denomina también complejo HLA (antígeno de leucocitos humano), están ubicados en
el cromosoma 6 en humanos. Las moléculas codificadas por los genes del MHC están presentes sobre las superficies
celulares, y son en gran medida responsables del reconocimiento de los trasplantes de tejidos como "no propios". Por
tanto, las moléculas del MHC unidas a membrana están íntimamente implicadas en el reconocimiento de antígenos
por parte de células T.

Los productos del MHC se agrupan en tres clases principales, denominadas I, II y III. Las células T que sirven
principalmente como células auxiliares expresan el CD4, y están restringidas primariamente por moléculas de la
Clase II, mientras que las células que expresan el CD8, las cuales representan mayoritariamente las células efectoras
citotóxicas, interaccionan con moléculas de la Clase I.

Las moléculas de la Clase I son glicoproteínas de membrana con la capacidad de unir péptidos derivados princi-
palmente de la degradación intracelular de proteínas endógenas. Los complejos de moléculas del MHC con péptidos
derivados de proteínas virales, bacterianas y otras proteínas extrañas comprenden el ligando que dispara la capacidad
de respuesta al antígeno de las células T. Por contra, los complejos de moléculas del MHC con péptidos derivados de
productos celulares normales juegan un papel en "enseñar" a las células T a tolerar los péptidos propios, en el timo.
Las moléculas de la Clase I no presentan antígenos enteros, intactos; más bien presentan fragmentos de péptidos de
los mismos, "cargados" sobre su "surco unidor de péptidos".

WO91/16924 describe procedimientos para potenciar la presentación de antígeno peptídico añadido exógenamente
por parte de células de mamífero presentadoras de antígeno.

Levy y Kvist (*International Immunology*, 2(10):995-1002 (1990)) describen el uso de vectores baculovirus inde-
pendientes para expresar MHC I, la beta-2-microglobulina y la proteínas del adenovirus-2, por separado y juntas en
células de insecto con objeto de investigar los efectos de la proteína adenovírica sobre el ensamblaje de los complejos
del MHC de la Clase I.

Durante muchos años, los inmunólogos han esperado generar células citotóxicas específicas que apuntaran a virus,
retrovirus y células cancerosas. Mientras que apuntar contra enfermedades víricas en general podía conseguirse me-
diante vacunación *in vivo* con vacunas vivas o atenuadas, no se ha conseguido un éxito similar con los retrovirus o con
las células cancerosas.

EP-360.205-A describe procedimientos para estimular la respuesta inmune de un paciente de cáncer contra el
cáncer. Se exponen *in vitro* linfocitos de la sangre periférica procedentes del paciente a células cancerosas procedentes
del mismo paciente, las cuales se han tratado con mitomicina C para impedir la proliferación. A continuación, los
linfocitos estimulados se administran de nuevo al paciente.

WO93/10.816 describe vacunas de péptidos que pueden usarse para inducir células T citotóxicas contra el VIH. Este documento sugiere que las células T citotóxicas procedentes de individuos inmunizados pueden aislarse, cultivarse y expandirse *in vitro* y a continuación administrarse de nuevo al paciente con objeto de impulsar la respuesta inmune contra el virus.

Más aún, la estrategia de la vacuna no ha tenido la eficacia deseada en pacientes inmunodeprimidos. Un forma de salvar esta dificultad sería inmunizar un individuo sano, aislar las células CD8 a partir de este individuo, e inyectar estas células CD8 en la persona afectada por la enfermedad. Este protocolo experimental parece funcionar en cepas endogámicas de ratones, pero no se ha intentado con éxito en humanos. Hay varios posibles explicaciones. En primer lugar, los péptidos son únicos para un MHC determinad; dicho de otra forma, ciertos péptidos antigénicos se unen preferentemente a especies particulares del MHC, pero no se unen bien a otras, incluso en ausencia de la molécula del MHC "preferida". Más aún, las moléculas del MHC son altamente polimórficas, hecho que general al menos dos problemas. El primero, las células CD8 de un individuo puede interaccionar sólo con péptidos unidos a precisamente aquellas de tres a seis moléculas de la Clase I presentes en ese individuo. El segundo, las células CD8 reaccionan violentamente con todas las moléculas de la Clase I, las cuales son diferentes de aquéllas expresadas en el individuo del que se obtienen las células CD8, con independencia de qué péptidos contienen las moléculas de la Clase I. Esta reactividad se ha observado desde hace cierto tiempo, y se denomina alo-reactividad. Es la causa que subyace al rechazo inmune de los órganos trasplantados.

Por tanto, aparte del algo heroico protocolo experimental en el que un individuo se usa como donante de células CD8 activadas para otro individuo, es difícil encontrar dos personas que no sean familiares con el mismo conjunto exacto de moléculas de la Clase I. Por esta razón, al menos un investigador ha adoptado la, algo inespecífica, estrategia de "impulsar" las células CD8 existentes incubándolas *in vitro* con IL-2, un factor de crecimiento para las células T. No obstante, este protocolo (conocido como terapia celular LAK) sólo permitirá la expansión de aquellas células CD8 que ya están activadas. Puesto que el sistema inmune está siempre activo, por un motivo u otro, la mayoría de las células estimuladas por la IL-2 serán irrelevantes para el propósito de combatir la enfermedad. De hecho, no se ha documentado que este tipo de terapia active *ninguna* célula con la especificidad deseada. Por tanto, los beneficios de la terapia celular LAK son controvertidos como mucho, y los efectos secundarios son generalmente tan graves que muchos estudios han sido interrumpidos.

Varias nuevas moléculas que parecen estar implicadas en el proceso de carga del péptido pueden haber sido recientemente identificadas. También se destaca que las moléculas de la Clase I sin péptido unido (es decir, moléculas "vacías") pueden producirse bajo ciertas condiciones restrictivas. Estas moléculas "vacías" son a menudo incapaces de alcanzar la superficie celular, no obstante, puesto que las moléculas de la Clase I sin péptido unido son muy termolábiles. Por tanto, las moléculas de la Clase I "vacías" se desensamblan durante su transporte desde el interior de la célula hacia la superficie celular. Este es un medio elegante mediante el cual el sistema inmune puede asegurar que sólo son destruidas las células que están sintetizando activamente proteínas virales. Por ejemplo, cuando se mata una célula infectada viralmente, está liberará péptidos virales. Si las células vecinas estuvieran expresando moléculas "vacías" de la Clase I -es decir, aquéllas sin péptido unido- estas células serían recubiertas por los péptidos virales liberados. Puesto que las células T citotóxicas (o células CD8) no tienen forma de discernir cómo o porqué un péptido está unido a una molécula de la Clase I, las células que obtuvieron pasivamente un recubrimiento de péptido viral serían destruidas al igual que aquéllas que están sintetizando activamente las proteínas virales.

Los péptidos virales *in vivo* son rotos por una gran partícula conocida como el proteosoma. Este complejo enzimático también rompe proteínas celulares normales, lo que sugiere que los péptidos derivados de nuestras propias proteínas celulares compiten con los péptidos derivados de virus por los sitios de unión de las moléculas de la Clase I. Por tanto, sólo algunas de las moléculas de la Clase I sobre la superficie de las célula infectada por virus contienen péptidos virales, puesto que la mayoría de las moléculas de la Clase I contendrán péptidos derivados de nuestras propias proteínas celulares. Puesto que hay cientos de miles de moléculas de la Clase I sobre la superficie de una célula, y puesto que las células CD8 pueden reconocer tan pocas como 200 moléculas de la Clase I cargadas con un determinado péptido viral, esta competición entre péptidos derivados de virus y proteínas celulares no compromete completamente la eficiencia por la que las células CD8 pueden destruir una célula infectada viralmente. Sin embargo, si uno fuera capaz de "diseñar" células para expresar moléculas de la Clase I exhibiendo *sólo una especie* de péptido antigénico -es decir, si todas las moléculas de la Clase I tuvieran el mismo péptido unido a ellas- se puede argumentar que esto incrementaría la eficiencia de la activación de CD8.

Las moléculas de la Clase I unen péptidos de una manera específica. Todos los péptidos tienen que ser de aproximadamente 8-9 aminoácidos de longitud, y sus secuencias deben ajustarse al bolsillo unidor de péptidos de las moléculas de la Clase I. En relación a esto, las moléculas de la Clase I presentan algunos parecidos con los anticuerpos. No obstante, mientras que un anticuerpo determinado tiende a unir sólo un antígeno, una molécula determinada de la Clase I puede unir muchos péptidos diferentes. Puesto que el número de virus y otros patógeno es bastante elevado, es evidente que nuestra defensa inmune sería pobre si tuviéramos sólo una única molécula de la Clase I, incluso si fuera capaz de unir y alterar muchos péptidos diferentes. Por esta razón, todos los humanos tienen entre tres y seis moléculas diferentes de la Clase I, las cuales pueden unir muchos tipos diferentes de péptidos. En consecuencia, las células CD8 pueden reconocer muchos miles de péptidos unidos a una u otra molécula de la Clase I.

Puesto que la selección parece ser la fuerza dominante en la evolución, aparecen patógenos que no pueden ser reconocidos eficientemente por el sistema inmune. Por tanto, una secuencia viral, la cual da lugar a péptidos que

se unen eficientemente a una diversidad de moléculas de la Clase I, puede mutar de forma que no sea reconocida por ninguna de las tres a seis moléculas de la Clase I presentes en un individuo. Por tanto, este virus puede no ser reconocido por el sistema inmune, y puede en consecuencia causar la muerte del individuo afectado. Si todos los individuos tuvieran un idéntico conjunto de moléculas de la Clase I, un virus tal puede, de forma concebible, eliminar una especie completa. No obstante, la variación individual es una salvaguardia frente esta posibilidad, puesto que hay unas 100 formas diferentes de moléculas de la Clase I presentes en la población. Por tanto, un virus mutado puede dañar algunos individuos, pero es improbable que resultara en la extinción de una población entera, puesto que individuos diferentes poseen diferentes conjuntos de moléculas de la Clase I.

Si las moléculas de la Clase I pueden unir una diversidad de péptidos, incluyendo péptidos derivados de nuestras propias proteínas celulares, uno puede preguntarse porqué las células CD8 del sistema inmune no reconocen y destruyen nuestros propios tejidos. Mientras que la respuesta a esta cuestión no está completamente clara, actualmente se cree que hay operativos dos mecanismos distintos. Primero, las células CD8 que pueden reaccionar con los péptidos propios son eliminadas en el timo. Segundo, las células CD8 pasan a no responder (anérgicas) a los péptidos propios en los órganos periféricos del sistema inmune. Puesto que cada tipo o epítipo de proteínas celulares no es sintetizado por las células en el timo, el segundo mecanismo parecería como la explicación más probable. Este mecanismo parece ser operativo para el nivel de péptidos propios que se encuentra normalmente. Si este nivel incrementa de alguna manera, se pueden observar individuos que sí que tienen células CD8 que pueden reconocer y destruir células que expresan péptidos propios. Esta última observación es significativa en relación al concepto de usar el sistema inmune para eliminar células tumorales.

Breve resumen de la invención

Una estrategia más directa para resolver los problemas discutidos más arriba sería estimular directa y específicamente sólo aquellas células CD8 que son relevantes para combatir la enfermedad. Recientes descubrimientos sobre los mecanismos que gobiernan la carga de péptido sobre las moléculas de la Clase I nos permiten hacerlo ahora. Puesto que *Drosophila* no tiene un sistema inmune, las diversas proteínas implicadas en la maquinaria cargadora del péptido deberían estar ausentes de tales células. Ahora es evidente que la ausencia de maquinaria cargadora de péptido permite que las moléculas de la Clase I sean expresadas como moléculas “vacías” sobre la superficie celular.

Otra ventaja de usar el sistema *Drosophila* es que las células de *Drosophila* prefieren una temperatura de 28°C en vez de 37°C. Este hecho es importante, puesto que las moléculas “vacías” de la Clase I son termolábiles y tienden a desintegrarse a 37°C. Mediante incubación de células de *Drosophila*, que expresan la Clase I, con péptidos que pueden unirse a la molécula de la Clase I, es posible conseguir que cada molécula de la Clase I contenga uno y el mismo péptido. Las células son, en consecuencia, muy diferentes de las células de mamífero, en las que la molécula de la Clase I contiene muchos tipos diferentes de péptidos, la mayoría de los cuales se derivan de nuestra propias, inocuas proteínas celulares.

A pesar de los numerosos, y fallidos, esfuerzos a lo largo de años en cientos de laboratorios para activar específicamente células CD8 *in vitro*, parece razonable que el nivel elevado de expresión de una molécula de la Clase I conteniendo un único péptido puede superar la necesidad se la estimulación *in vivo* del sistema. Mediante la incubación de células de *Drosophila* convenientemente tratadas con células de bazo o nódulo linfático procedentes de ratones no cebados (es decir, ratones que nunca se habían encontrado previamente con los péptidos usados), es posible ahora generar células T citotóxicas que son totalmente específicas para el péptido antigénico. La respuesta citotóxica es usualmente de tres a cinco veces más intensa que la que se obtiene a través de procedimientos previamente conocidos.

Mientras que algunos ejemplos en éste presentan un “modelo” usando moléculas de la Clase I de ratón, se descubren en la presente invención otros ejemplos que usan moléculas de la Clase I humana, o ratones transgénicos expresando moléculas humanas. En un ejemplo, se usa un péptido derivado de la proteína *gag* del VIH (el virus del SIDA). Esta combinación de moléculas funciona bien; de hecho, funciona tan bien como los experimentos que usan un modelo de ratón puro. Más aún, el sistema actualmente descubierto, el cual usa moléculas humanas en un sistema de *Drosophila* tal como se descubre, es mucho más versátil que el sistema de ratón descrito en un artículo reciente por DeBruijn *et al.* (*Eur. J. Immunol.* 21:2963-2970 (1991)). En concreto, éste último sistema requiere cantidades enormes de células efectoras con objeto de matar efectivamente, y es menos versátil que el sistema descubierto en la presente invención. De forma más importante, el sistema descubierto en la presente invención, a diferencia que el sistema de ratón, eficientemente usa y activa respuestas contra moléculas humanas.

La mayoría de los experimentos, descubiertos en la presente invención, realizados hasta la fecha han usado células intactas de *Drosophila*. No obstante, se demuestra ahora que pueden obtenerse moléculas vacías, truncadas, a partir de células de *Drosophila* con buenos rendimientos (aproximadamente 1 mg/ml). Tales moléculas pueden ser útiles para conseguir la inmunosupresión en pacientes trasplantados y para el tratamiento de pacientes con enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide.

En resumen, nuestra dedicación a largo plazo, destinada a comprender los detalles de cómo se generan los péptidos y se cargan sobre moléculas de la Clase I *in vivo*, ha estimulado el desarrollo de un medio racional y altamente eficiente por el cual las células CD8 pasan a estar activadas con péptidos de nuestra elección. Es nuestra creencia que el uso de tales células activadas puede tener un papel en el tratamiento de una amplia variedad de estados morbosos.

Se descubre ahora, en la presente invención, un medio racional, elegante, de producir, cargar y usar moléculas de la Clase I para activar específicamente células CD8 *in vitro*. Se descubren además las aplicaciones terapéuticas de esta nueva tecnología en el tratamiento del cáncer, de tumores o neoplasias, así como de enfermedades virales, retrovirales, autoinmunes, y del tipo autoinmune.

La presente invención proporciona un procedimiento para producir *in vitro* células CD8 activadas, en donde un procedimiento comprende poner en contacto, *in vitro*, células CD8 con moléculas del MHC de la Clase I humanas cargadas de antígeno, y expresadas sobre la superficie de células de insecto, durante un período de tiempo suficiente para activar, de forma específica para un antígeno, las células CD8. En una variación, las moléculas expresadas sobre la superficie son monotípicas; en otra, las moléculas expresadas sobre la superficie son mono-antigénicas. El procedimiento contemplado en la presente invención puede comprender además (a) separar las células CD8 activadas de las moléculas de la Clase I cargadas de antígeno, (b) suspender las células CD8 activadas en un portador o excipiente aceptable. De acuerdo con los procedimientos descubiertos, los antígenos pueden comprender proteínas o polipéptidos nativos o no degradados, o pueden comprender polipéptidos antigénicos que se han cortado en fragmentos peptídicos, que comprenden al menos 8 residuos aminoácidos, antes de la incubación con las moléculas de la Clase I humanas.

Una célula T CD8 activada mediante los procedimientos de la invención puede usarse en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer, tumor, o neoplasia, infección vírica (por ejemplo, retrovírica), o una condición autoinmune.

El medicamento puede ser apropiado para su administración mediante inyección intravenosa.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 esquematiza la construcción de los plásmidos de expresión pRmHa-2 y pRmHa-3. En la Figura 1A se muestra la construcción del pRmHa-2; en la Figura 1B se muestra la construcción del pRmHa-3M; y en la Figura 1C, se ilustra el vector pRmHa-3, mostrando la restricción, el poliengarce, el promotor, y los sitios de poliadenilación, así como un sitio en el que puede insertarse una secuencia de nucleótidos para su expresión.

La Figura 2A muestra que el K^b Clase I MHC/β2 de ratón (mβ2) y el D^b/mβ2 expresados en células de *Drosophila* tienen las características del péptido libre o moléculas “vacías” de la Clase I. Las células de *Drosophila* que expresaban el K^b/β2, L^d/β2, y D^b/β2 se marcaron durante 45 minutos con 35S-metionina y se prepararon los lisados. Cada lisado se dividió en cuatro alícuotas, a las que se añadió OVA, NP o péptido GP2, o ningún péptido. Después de su incubación durante 1 hora a 4°C, se incubó la otra durante 1 hora a 30°C. A continuación se inmunoprecipitaron las moléculas de la Clase I a partir de los lisados, y se analizaron mediante SDS-PAGE. La Figura 2B ilustra los resultados de un ensayo de lisados de células radiactivos, preparados a partir de células de *Drosophila*, que expresaban K^b/β2, L^d/β2, y D^b/β2, con microglobulina β2 de ratón o humana. Se representa la temperatura de incubación (en °C) frente la inmunoprecipitación de la cadena pesada (en %). Se muestran: K^b/mβ2 (cuadrados vacíos), K^b/mβ2 + OVA (cuadrados rellenos), L^d/mβ2 (triángulos vacíos), L^d/mβ2 + NP (triángulos rellenos), D^b/β2 (círculos vacíos), y D^b/β2 + INF (círculos rellenos).

La Figura 3 (A y B) muestra la fluorescencia promedio de células de *Drosophila* transfectadas, cultivadas en medio carente de suero, según se determinó mediante citofluorimetría, después de teñir el K^b/mβ2 con anticuerpo Y3, y el D^b/mβ2 con el anticuerpo B22.249. Antes de la tinción, y tal como se indica en la figura, las células se incubaron en el péptido (25 μg/ml) durante una hora a 27°C, seguida por una incubación de 2 hora a 37°C. La fluorescencia media de cada población celular tratada se muestra representada frente a las condiciones de incubación. La Figura 3A muestra que las moléculas de la Clase I expresadas sobre la superficie de células de *Drosophila* son rápidamente desnaturalizadas a 37°C, de tal forma que ya no pueden ser reconocidas por los anticuerpos anti-Clase I. La Figura 3B muestra que las moléculas del MHC de la Clase I expresadas en células de *Drosophila* son termolábiles en lisados de Triton X-100 a menos que se preincuben en presencia del péptido que se sabe se une específicamente a la Clase I.

La Figura 4 ilustra datos procedentes de un experimento diseñado para determinar si las células de insectos pueden procesar antígeno y cargarlo sobre las moléculas de la Clase I, y si éstas últimas pueden presentar, endógena o exógenamente, antígeno derivado a las células T. Se incubaron células Schneider 2 (SC2) o 3T3, transfectadas con K^b/β2, con proteína ovoalbúmina (OvPro) o el péptido ovoalbúmina OVA 24 (OvPep) en medio isotónico (Iso) o hipertónico (Hyp). La línea celular de ratón BALE/3T3 está disponible a partir de la ATCC bajo el número de acceso CCL 163). Después del tratamiento, las células se cocultivaron con el hibridoma B3/CD8 de célula T. El B3/CD8 es un hibridoma de célula T entre B3 (Carbohe *et al.*, *J. Exp. Med.* 169:603-612 (1989)), célula T citotóxica específica para el péptido de ovoalbúmina 253-276 presentado por moléculas H-2K^b de la Clase I, y la línea celular secretora de IL-2 y portadora de CD8. A partir de la estimulación antigénica, la B3/CD8 produce IL-2, medida mediante incorporación de ³H-timidina en la línea celular CTLL dependiente de IL-2 (Gillis *et al.*, *J. Immunol.* 120:2027-2029 (1978)). Por tanto, midiendo la cantidad de IL-2 producida, uno puede ensayar el reconocimiento por parte de la célula T.

El sobrenadante procedente de los cultivos se analizó en busca de IL-2 mediante la incorporación de ³H-timidina en parte de la línea celular CTLL dependiente de IL-2 (ATCC n° TIB 214). La cantidad de ³H-timidina incorporada se representa frente los tratamientos iniciales de las células.

La Figura 5A muestra la termoestabilización, inducida por el péptido, de la HLA B27 y HLA A2.1 expresadas sobre la superficie de células de *Drosophila* por parte de péptidos del VIH. La fluorescencia promedio de cada población celular se muestra representada frente las condiciones de incubación.

5 La Figura 5B muestra que la HLA B7 expresada en células de *Drosophila* tiene las características de las moléculas de la Clase I vacías en lisados de Triton X100.

La Figura 5C ilustra que la HLA A2.2Y expresada en células de *Drosophila* tiene las características de las moléculas de la Clase I vacías en lisados de Triton X100.

10

La Figuras 6 ilustra la inducción de la respuesta de CD8 primaria después de la estimulación *in vitro* de CD8 en presencia o ausencia de péptidos. Las que responden son células B6 del bazo de ratón, y las estimulantes son RMA-S (triángulos vacíos); RMA-S más OVA (triángulos rellenos); *Drosophila* más OVA (cuadrados vacíos); y K^b de *Drosophila* más OVA (cuadrados rellenos). En 6A, la diana son células RMA-S y el péptido de ovalbúmina; en 15 6B, la diana son células RMA-S. En ambos diagramas se representa el porcentaje de lisis respecto la proporción de efector/diana.

La Figura 7 ilustra la respuesta de inducción después de la estimulación *in vitro* de CD8 con células de *Drosophila* en presencia o ausencia de péptido. En 7, los esplenocitos C57 B1/6 que responden son estimulados con células de 20 K^b de *Drosophila* y OVA. Las células diana incluyen: EL4 (cuadrados vacíos con un punto en el centro); EL4 OVA (rombos rellenos); EL4 + péptido de OVA (cuadrados negros con un punto blanco en el centro); RMA-S + péptido de OVA (diamantes negros con un punto blanco en el centro); y RMA-S (cuadrados sólidos). Se representa el porcentaje de lisis respecto la proporción de efector/diana.

25 La Figura 8 (A y B) ilustra el cebado *in vivo* con células transfectadas de *Drosophila*, en donde las que responden son esplenocitos C57 B1/6 de ratón. En 8A, algunas de las células están fijadas; en 8B, las células de *Drosophila* están todas sin fijar. En 8A las células estimulantes de mosca son tal como sigue: K^b (cuadrados vacíos con un punto central); K^b OVA fijadas (rombos rellenos); K^b OVA fijadas + S/N (cuadrado negro con un punto blanco en el centro); K^b OVA (sin fijar) (rombo negro con un punto blanco en el centro). En 8B, las células estimulantes de mosca se ilustran 30 como sigue: K^b (cuadrados vacíos con un punto central); K^b/OVA (rombos rellenos); K^b/OVA *in vivo*/K^b/OVA *in vitro* (cuadrados rellenos con un punto blanco en el centro); K^b/OVA *in vivo*/D^b/OVA *in vitro* (rombos rellenos con un punto blanco en el centro); y D^b OVA (cuadrados rellenos). En ambas, A y B, se representa el porcentaje de lisis respecto la proporción de efector/diana.

35 La Figura 9 ilustra el resultado de un experimento en el que se inyectaron células C57BL/6 de ratón con 3MM EL4 OVA y, subsiguientemente, con células de *Drosophila* y sin células. El porcentaje de supervivencia de cada una de las tres poblaciones de ratón se representa respecto el número de días de supervivencia. El grupo I (rombos rellenos) recibió una inyección subcutánea de células 50MM de *Drosophila* vivas, que expresaban K^b/OVA, 5 días después de la inyección de EL4; el grupo II (cuadrados vacíos) recibió células 50 MM de *Drosophila* fijadas, que 40 expresaban K^b/OVA, 5 días después de la inyección de EL4; y el grupo III (círculos rellenos), el grupo control, no recibió inyecciones adicionales. Los ratones del grupo II se sacrificaron el día 20; los ratones del grupo III el día 23.

Las Figuras 10A, B, y C ilustran la activación *in vitro* con células transfectadas de *Drosophila*. En ambas, A y B, las células que responden eran células de bazo de ratón transgénicas de la B7/humana microglobulina β2. Las células 45 diana eran Jurkat (cuadrados vacíos con un punto central), y Jurkat recubiertas con el péptido A GAG de VIH (rombos rellenos), tal como se ilustra en ambas, A y B. En 10A, las células estimulantes son células de *Drosophila* con el GAG B7 del VIH (A); en 10B, éstas son células de *Drosophila* con B7. En 10C, las células que responden son células de bazo de ratón transgénico B7 estimuladas mediante VPR B7 de *Drosophila*. Las células diana son Jurkat (cuadrados vacíos con un punto central); Jurkat/VPR (rombos rellenos); RMA-S (cuadrados rellenos); y RMA-S/VPR (rombos 50 vacíos con un punto central). El porcentaje de lisis se presenta respecto la proporción de efector/diana en A, B y C.

Las Figuras 11A, B, y C ilustran la activación *in vitro* con células de *Drosophila* transfectadas. En 11A, las células que responden son PBL HLA B7 humanas estimuladas con células B7 VPR de *Drosophila*. El porcentaje de lisis se presenta respecto la proporción de efector/diana. Las células diana son Jurkat VPR (cuadrados vacíos con un punto central); EL4 B7 (rombos rellenos); Jurkat (cuadrados rellenos); y EL4 B7 VPR (rombos rellenos con un punto 55 central). En 11B, las células que responden son PBL HLA2 humanos estimulados con células A2 GAG (A) (VIH) de *Drosophila*. El porcentaje de lisis se presenta respecto la proporción de efector/diana. Las células diana son Jurkat A2 (rombos rellenos) y Jurkat A2 GAG (A) (cuadrados vacíos con un punto central). En 11C, las células que responden son PBL B27 humanos estimulados con células B27 VPR (VIH) de *Drosophila*. Las células diana son Jurkat A2 60 (rombos rellenos) y Jurkat A2 GAG (A) (cuadrados vacíos con un punto central). El porcentaje de lisis se presenta respecto la proporción de efector/diana.

La Figura 12 ilustra la activación *in vitro* con células transfectadas de *Drosophila*. Las células que responden son PBL HLA A2.1 humanos estimulados con células A2.1 de *Drosophila* recubiertas con péptido POL de VIH. El 65 porcentaje de lisis se presenta respecto la proporción de efector/diana. Las células diana son Jurkat A2.1 de VIH (cuadrados vacíos con un punto central) y Jurkat A2.1 (rombos rellenos).

Descripción detallada de la invención**A. Definiciones**

- 5 *Aminoácido*: Todos los residuos aminoácidos identificados en la presente invención tienen la configuración L natural. De acuerdo con la nomenclatura estándar de polipéptidos, *J. Biol. Chem.* 243:3557-3559 (1969), las abreviaturas de los residuos aminoácidos son tal como se muestran en la siguiente Tabla de Correspondencias:

TABLA DE CORRESPONDENCIAS

10

	Símbolo		Aminoácido
	1 Letra	3 Letras	
15	Y	Tyr	L-tirosina
	G	Gly	glicina
	F	Phe	L-fenilalanina
	M	Met	L-metionina
20	A	Ala	L-alanina
	S	Ser	L-serina
	I	Ile	L-isoleucina
	L	Leu	L-leucina
25	T	Thr	L-treonina
	V	Val	L-valina
	P	Pro	L-prolina
	K	Lys	L-lisina
30	H	His	L-histidina
	Q	Gln	L-glutamina
	E	Glu	ácido L-glutámico
	W	Trp	L-triptófano
	R	Arg	L-arginina
35	D	Asp	ácido L-aspartico
	N	Asn	L-asparagina
	C	Cys	L-cisteína

40

Debería destacarse que todas las secuencias de residuos aminoácidos se representan con una fórmula cuyo orientación de izquierda a derecha está en la dirección convencional de extremo amino-terminal a extremo carboxi-terminal.

45

Par de bases (pb): es una pareja de adenina (A) con timina (T), o de citosina (C) con guanina (G) en un doble hélice de ADN.

Clon: describe un gran número de células o moléculas idénticas con una única célula o molécula ancestral.

50

Bases complementarias: los nucleótidos que normalmente se emparejan cuando el ADN o ARN adopta una configuración de doble hebra.

55

Secuencia de nucleótidos complementaria: una secuencia de nucleótidos en una molécula de ADN o ARN de hebra única que es suficientemente complementaria a aquella en otra hebra única como para hibridarse específicamente con ésta con los consiguientes puentes de hidrógeno.

60

Conservada: una secuencia de nucleótidos está conservada con respecto a una secuencia previamente seleccionada (de referencia) si se hibrida de forma no aleatoria, hasta una complementariedad exacta, con la secuencia previamente seleccionada.

Cadena abajo: identifica secuencias que progresan más allá en la dirección de expresión; por ejemplo, la región codificante de un polipéptido para un gen está cadena abajo respecto el codón de inicio.

65

Expresión: el proceso sufrido por un gen estructural para producir un polipéptido. Es una combinación de transcripción y traducción.

Gen (Cistrón): un ácido nucleico cuya secuencia nucleotídica codifica un ARN o un polipéptido. Un gen puede ser de ARN o ADN. También puede incluir regiones que preceden o siguen a la región codificante (líderes o trailers), así como secuencias intercaladas (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

Hibridación: el emparejamiento de secuencias nucleotídicas sustancialmente complementarias (hebras de ácidos nucleicos) para formar un dúplex o heterodúplex mediante el establecimiento de puentes de hidrógeno entre pares de bases complementarias. Es una interacción específica, es decir, no es aleatoria, entre dos polinucleótidos complementarios que puede ser inhibida competitivamente.

Ligando: el ligando se refiere a una molécula que contiene una porción estructural que está unida mediante interacción específica con una proteína receptora determinada.

Nucleótido: una unidad monomérica de ADN o ARN, consistente en una porción azúcar (pentosa), un grupo fosfato, y una base nitrogenada heterocíclica. La base está unida a la porción azúcar mediante un enlace glicosídico (al carbono 1' de la pentosa), y esa combinación de base y azúcar es un nucleósido. Cuando el nucleósido contiene un grupo fosfato unido en la posición 3' o 5' de la pentosa, se denomina nucleótido. Una secuencia de nucleótidos operativamente unidos se denomina típicamente en la presente invención como "una secuencia de bases" o "secuencia nucleotídica", y sus equivalentes gramaticales, y se representa en la presente invención mediante una fórmula cuya orientación de izquierda a derecha está en la dirección convencional del extremo 5' al extremo 3'.

Oligonucleótido o polinucleótido: un polímero de nucleótidos de hebra única o doble. Tal como se usa en la presente invención, "oligonucleótido", y sus equivalentes gramaticales, incluirán un rango completo de ácidos nucleicos. Un oligonucleótido se referirá típicamente a una molécula de ácido nucleico formada por una hebra lineal de ribonucleótidos. El tamaño exacto dependerá de muchos factores, los cuales a su vez dependen de la condición final de uso, tal como es bien sabido en la técnica.

Pauta de lectura abierta: una secuencia nucleotídica, usualmente una secuencia de ADN, la cual es (potencialmente) traducible en una proteína.

Polipéptido o péptido son términos usados de forma intercambiable en la presente invención para designar una serie lineal de residuos aminoácidos, conectados los unos a los otros mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carboxilo de residuos adyacentes.

Receptor: Receptor y proteína receptora son términos usados de forma intercambiable en la presente invención para indicar una molécula proteica biológicamente activa que une específicamente a (o con) otras moléculas.

Molécula de ADN recombinante (rADN): una molécula de ADN producida uniendo operativamente una secuencia de ácido nucleico, tal como un gen, a una secuencia de molécula de ADN de la presente invención. Por tanto, una molécula de ADN recombinante es una molécula de ADN híbrida que comprende, al menos, dos secuencias nucleotídicas que normalmente no se encuentran juntas en la naturaleza. Los rADN que no tienen un origen biológicamente común, es decir, que son evolutivamente distintos, se dice que son "heterólogos".

Sustancialmente homólogo quiere decir que una secuencia o molécula determinada, por ejemplo, una secuencia mutante que es sujeto, varía respecto a una secuencia de referencia mediante una o más sustituciones, supresiones, o adiciones, el efecto neto de las cuales no resulta en una diferencia funcional adversa entre las secuencias de referencia y del sujeto. Para los propósitos de la presente invención, se consideran sustancialmente homólogas las secuencias de aminoácidos que tienen más del 90 por ciento de similitud, actividad biológica equivalente, y características de expresión equivalentes. Las secuencias de aminoácidos que tienen más del 40 por ciento de similitud se consideran sustancialmente similares. Para los propósitos de determinar la homología o similitud, deberían descartarse la truncación o supresiones internas de la secuencia de referencia, así como también deberían descartarse las modificaciones subsiguientes de la molécula, por ejemplo, la glicosilación. Las secuencias que tienen niveles de homología inferiores y bioactividad comparable se consideran equivalentes.

Transfección: es la adquisición de nuevos marcadores genéticos mediante la incorporación de ADN añadido en células eucariotas.

Vector: un ácido nucleico, preferiblemente una molécula de ADN, capaz de replicación autónoma en una célula, y al cual se puede unir operativamente un segmento de ácido nucleico, por ejemplo, un gen o polinucleótido (preferiblemente de ADN), para incorporar la replicación del segmento unido. Los vectores capaces de dirigir la expresión de segmentos (genes) de ácidos nucleicos (preferiblemente de ADN) que codifican una o más proteínas, se denominan en la presente invención "vectores de expresión". Otra variedad de vectores importante permite la clonación de cADN (ADN complementario) a partir de mRNA producidos usando la transcriptasa inversa.

Vector de clonación: es cualquier plásmido o virus en el que puede insertarse una secuencia nucleotídica ajena (preferiblemente ADN) a clonar.

Vector de expresión: es cualquier plásmido o virus en el que puede insertarse o expresarse una secuencia nucleotídica ajena (preferiblemente ADN).

B. Descripción detallada

1. Moléculas del MHC de la Clase I humanas

Una molécula del MHC de la Clase I humana de la presente invención se selecciona de entre el grupo formado por HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, y HLA-G, y más preferiblemente, de entre el grupo comprendido por HLA-A, HLA-B, y HLA-C.

Aunque es posible aislar secuencias nucleotídicas que codifican moléculas del MHC de la Clase I procedentes de líneas celulares, establecidas y bien conocidas, portadoras de las variantes apropiadas -por ejemplo, las líneas celulares transformadas JY, BM92, WIN, MON Y MG- es más práctico sintetizar la secuencia nucleotídica, a partir de una porción del gen, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores apropiados. Este procedimiento se ha usado exitosamente para clonar el cADN de longitud completa de HLA; por ejemplo, las secuencias para HLA-A25, HLA-A2, HLA-B57, HLA-51, y HLA-37 están depositadas en la base de datos GenBank con los números de acceso M32321, M32322, M32317, M32318, M32319 y M32320, respectivamente. Están publicadas secuencias de nucleótidos y aminoácidos parciales y putativas del HLA, incluyendo la secuencia consenso (ver, por ejemplo, Zemmour y Parham, *Immunogenetics* 33:310-320 (1991)), y se conocen, y están generalmente disponibles, líneas celulares que expresan variantes del HLA, muchas de ellas a partir de la American Type Culture Collection ("ATCC"). Por tanto, usando la PCR, es posible sintetizar secuencias nucleotídicas que codifican el MHC de la Clase I humana, las cuales pueden a continuación unirse de forma operativa a un vector, y usarse para transformar un célula apropiada y expresarlas en la presente invención.

Los procedimientos particularmente preferidos para producir las moléculas del MHC de la Clase I humanas y moléculas de la microglobulina $\beta 2$ humana de la presente invención se basan en el uso de oligonucleótidos preseleccionados como cebadores en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para formar productos de reacción de la PCR tal como se describe en la presente invención. LA preparación de los genes del MHC y de la microglobulina $\beta 2$ se consigue típicamente mediante la extensión del cebador, preferiblemente mediante la extensión del cebador en un formato de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Si los genes han de producirse mediante amplificación (PCR), deben usarse dos cebadores, es decir, un par cebador de PCR, para cada hebra codificantes de ácido nucleico a amplificar. (Por motivos de simplicidad, se discutirá la síntesis de una variante de HLA de ejemplo, pero debe sobrentenderse expresamente que el procedimiento de amplificación mediante PCR descrito es igualmente aplicable a la síntesis de microglobulina $\beta 2$ y todas las variantes de HLA, incluyendo aquellas cuyas secuencias completas son actualmente desconocidas). El primer cebador pasa a formar parte de la hebra sin sentido (negativa o complementaria) y se hibrida a una secuencia nucleotídica conservada de entre las hebras (positivas o codificantes) de HLA. Para producir homólogos del ADN codificante, los primeros cebadores se escogen, por tanto, para que se hibriden a (es decir, sean complementarios de) regiones conservadas dentro de los genes del MHC, preferiblemente la secuencia consenso o similar, regiones conservadas dentro de cada grupo de HLA -es decir, secuencias consenso dentro de HLA-A, HLA-B, HLA-C, y los grupos menos polimórficos HLA-E, -F y -G. Los segundos cebadores pasan a formar parte de la hebra codificante (positiva) y se hibridan a una secuencia nucleotídica conservada entre las hebras negativas. Para producir los homólogos del ADN codificante de HLA, los segundos cebadores se escogen, por tanto, para hibridarse a una secuencia nucleotídica conservada en el extremo 5' del gen que codifica HLA, así como en aquella área que codifica la región líder o primera estructural. Debería destacarse que en la amplificación de los homólogos de ADN codificante, la secuencia nucleotídica 5' conservada del segundo cebador puede ser complementaria a una secuencia añadida exógenamente usando la transferasa de desoxinucleotidil terminal, tal como describieron Loh *et al.*, *Science* 243:217-220 (1989). Uno o ambos de los cebadores primero y segundo pueden contener una secuencia nucleotídica que defina un sitio de reconocimiento de endonucleasa. Es sitio puede ser heterólogos al gen de la inmunoglobulina que se está amplificando, y típicamente aparece en o cerca del extremo 5' del cebador.

El primer cebador de un par cebador de PCR se denomina en la presente invención "cebador con sentido", puesto que se hibrida con la hebra codificante o con sentido de un ácido nucleico. Además, el segundo cebador de un par cebador de PCR se denomina en la presente invención "cebador anti-sentido", puesto que se hibrida con la hebra no codificante o anti-sentido de un ácido nucleico, es decir, una hebra complementaria a una hebra codificante. Una pluralidad de primer cebador y/o una pluralidad de segundos cebadores pueden usarse para formar diferentes pares cebadores. Alternativamente, puede usarse un par individual de primero y segundo cebadores. En cualquier caso, los productos de amplificación de las amplificaciones que usan la misma o diferentes combinaciones de primero y segundo cebadores pueden combinarse para incrementar la diversidad de la biblioteca de genes.

Cuando está presente, la porción que define el sitio de restricción está típicamente ubicada en una porción 5' no cebadora del cebador. El sitio de restricción definido por el primer cebador se escoge típicamente para que sea uno reconocido por un enzima de restricción que no reconozca el sitio de restricción definido por el segundo cebador, siendo el objetivo ser capaz de producir una molécula de ADN que tiene extremos adhesivos que no son complementarios entre ellos, y que, por tanto, permiten la inserción en una dirección en un vector.

En una realización, la presente invención utiliza un conjunto de polinucleótidos para formar cebadores que tienen una región cebadora ubicada en el extremo 3' del cebador. La región cebadora corresponde típicamente a las 15 a 30 bases de nucleótidos más 3' (3'-terminales). La porción cebadora 3'-terminal de cada cebador es capaz de actuar como

un cebador para catalizar la síntesis de ácidos nucleicos, es decir, inicial una reacción de extensión del cebador a partir de su extremo 3'. Uno o ambos cebadores pueden adicionalmente contener una porción no cebadora 5'-terminal (la más 5'), es decir, una región que no participa en la hibridación de la plantilla de HLA.

En PCR, cada cebador trabaja en combinación con un segundo cebador para amplificar una secuencia diana de ácido nucleico. La elección de pares cebadores de PCR para su uso en PCR está gobernada por consideraciones como la que se discuten en la presente invención para producir moléculas del MHC de la Clase I y microglobulina $\beta 2$. Esto es, los cebadores tienen una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia conservada en el gen de elección. Las secuencias cebadoras útiles se descubren en la presente invención más adelante.

La estrategia usada para clonar los genes de HLA dependerá, como es bien sabido en la técnica, del tipo, complejidad, y pureza de los ácidos nucleicos que conforman los diversos genes del HLA. Otros factores incluyen, si los genes han de ser amplificados y/o mutados.

En general, los genes del HLA están formados por hebras que codifican polinucleótidos, tales como la del mRNA y/o la hebra con sentido del ADN genómico. Si el HLA está en forma de ADN genómico de doble hebra, habitualmente se desnatura primero, típicamente fundiéndolo, en hebras sencillas. Una secuencia de HLA se somete a una reacción de PCR tratando (o poniendo en contacto) la secuencia con un par cebador de PCR, teniendo cada miembro del par una secuencia nucleotídica preseleccionada. El par cebador de PCR es capaz de iniciar las reacciones de extensión del cebador hibridándose a las secuencias nucleotídicas, preferiblemente a al menos 10 nucleótidos de longitud, y más preferiblemente a al menos aproximadamente 20 nucleótidos en longitud, conservados dentro de la secuencia de HLA.

La reacción de la PCR se realiza mezclando el par cebador de la PCR, preferiblemente una cantidad predeterminada del mismo, con ácidos nucleicos del gen de la HLA, preferiblemente una cantidad predeterminada de los mismos, en un tampón de la PCR, para formar una mezcla de reacción de la PCR. La mezcla se mantiene en condiciones de síntesis de polinucleótidos durante un período de tiempo, el cual está típicamente predeterminado, suficiente para la formación de un producto de reacción de la PCR, produciendo, por tanto, una pluralidad de diferentes homólogos de ADN que codifican el HLA.

En otra estrategia, el objeto es clonar los genes codificando la variante de HLA a partir de una variante de HLA proporcionando un complemento de polinucleótido del HLA, tal como la hebra anti-sentido del dsADN genómico o el polinucleótido producido sometiendo el mRNA a una reacción de transcriptasa inversa. Los procedimientos para producir tales complementos son bien conocidos en la técnica.

La reacción de la PCR se realiza usando cualquier procedimiento apropiado. Generalmente ocurre en una solución acuosa tamponada, es decir, un tampón de PCR, preferiblemente a un pH de 7-9, más preferiblemente aproximadamente a 8. Preferiblemente, se mezcla un exceso molar (para ácido nucleico genómico, usualmente aproximadamente 10^6 :1 cebador:plantilla) del cebador con el tampón que contiene la hebra de plantilla. Se prefiere un gran exceso molar para mejorar la eficiencia del proceso.

El tampón de la PCR también contiene preferiblemente los trifosfatos de desoxirribonucleótido, dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, y una polimerasa, típicamente termoestable, todo en las cantidades apropiadas para la reacción de extensión del cebador (síntesis de polinucleótidos). La solución resultante (mezcla de la PCR) se calienta a aproximadamente 90°C-100°C durante aproximadamente 1 a 10 minutos, preferiblemente de 1 a 4 minutos. Después de este período de calentamiento, se deja enfriar la solución hasta 54°C, que es preferible para la hibridación del cebador. La reacción de síntesis puede ocurrir a, desde temperatura ambiente hasta una temperatura por encima de la cual la polimerasa (agente inductor) ya no funciona eficientemente. Por tanto, por ejemplo, si se usa la polimerasa de ADN como agente inductor, la temperatura no es generalmente superior a aproximadamente 40°C. Un ejemplo de tampón de la PCR comprende lo siguiente: KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; pH 8,3; MgCl₂ 1,5 mM; gelatina al 0,001% (peso/volumen); dATP 200 μ M; dATP 200 μ M; dTTP 200 μ M; dCTP 200 μ M; y dGTP 200 μ M; 2,5 unidades de polimerasa I de ADN de *Thermus aquaticus* (patente estadounidense n° 4.889.818) por 100 microlitros de tampón.

El agente inductor puede ser cualquier compuesto o sistema que funcionará para conseguir la síntesis de productos de extensión del cebador, incluyendo los enzimas. Los enzimas apropiados para este propósito incluyen, por ejemplo, la polimerasa I de ADN de *E. coli*, el fragmento Klenow de la polimerasa I de ADN de *E. coli*, la polimerasa de ADN del T4, otras polimerasas de ADN disponibles, la transcriptasa inversa, y otros enzimas, incluyendo enzimas termoestables, los cuales facilitarán la combinación de los nucleótidos libres en la disposición correcta para formar los productos de extensión del cebador que son complementarios a cada hebra de ácido nucleico. Generalmente, la síntesis se iniciará en el extremo 3' de cada cebador, y procederá en la dirección 5' a lo largo de la hebra de plantilla, hasta que se termine la síntesis, produciendo moléculas de diferentes longitudes. No obstante, puede haber agentes que iniciaran la síntesis en el extremo 5' y procederían en la dirección anterior, usando el mismo proceso que se ha descrito más arriba.

El agente inductor también puede ser un compuesto o sistema que funcionaría para conseguir la síntesis de productos de extensión del cebador de ARN, incluyendo enzimas. En las realizaciones preferidas, el agente inductor puede ser una polimerasa de ARN dependiente de ADN, tal como la polimerasa de ARN del T7, la polimerasa de ARN del T3, o la polimerasa de ARN de SP6. Estas polimerasas producen un polinucleótido de ARN complementario. La

elevada velocidad de recambio de la polimerasa de ARN amplifica el polinucleótido inicial, tal como ha sido descrito por Chamberlin *et al.*, *The Enzymes*, ed. P. Boyer, pp. 87-108, Academic Press, Nueva York (1982). Otra ventaja de la polimerasa de ARN de T7 es que pueden introducirse mutaciones en la síntesis del polinucleótido remplazando una porción de cADN con uno o más oligodesoxinucleótidos (polinucleótidos) mutados y transcribiendo directamente la

Si el agente inductor es una polimerasa de ARN dependiente de ADN, e incorpora por tanto trifosfatos de ribonucleótidos, se mezclan cantidades suficientes de ATP, CTP, GTP y UTP con la mezcla de extensión del cebador y la solución resultante se trata tal como se describe más arriba.

La hebra sintetizada de nuevo y su hebra de ácido nucleico complementaria forman una molécula de doble hebra, la cual puede usarse en los pasos siguientes del proceso.

Después de procesar homólogos de ADN que codifican la variante del HLA, para uno o una pluralidad de genes diferentes dentro del sistema del HLA, las moléculas de ADN se amplifican típicamente aún más. Mientras que las moléculas de ADN pueden ser amplificadas mediante técnicas clásicas, tales como la incorporación en un vector de replicación autónomo, se prefiere amplificar primero las moléculas sometidas a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) antes de insertarlas en un vector. La PCR se realiza típicamente mediante termociclado, es decir, incrementando y disminuyendo repetidamente la temperatura de una mezcla de reacción de la PCR dentro de un rango de temperaturas cuyo límite inferior es desde aproximadamente 10°C hasta 40°C, y cuyo límite superior es desde aproximadamente 90°C hasta 100°C. El incremento y disminución puede ser continuo, pero es preferiblemente por fases, con períodos de tiempo de estabilidad relativa de la temperatura a cada temperatura, favoreciendo la síntesis de polinucleótido, la desnaturalización y la hibridación.

Los procedimientos de amplificación mediante la PCR se describen en detalle en las patentes estadounidenses nº 4.683.192, 4.683.202, 4.800.159, y 4.965.188, y al menos en varios textos, incluyendo "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Ed. H. Erlich, Stockton Press, Nueva York (1989); y "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Eds. Innis *et al.*, Academic Press, San Diego, California (1990). Varios procedimientos y cebadores usados en la presente invención se describen en la presente invención más adelante, y son descritos también, por ejemplo, por Nilsson *et al.*, *Cell* 58:707 (1989), Ennis *et al.*, *PNAS USA* 87:2833-2837 (1990), y Zemmour *et al.*, *Immunogenetics* 33:310-320 (1991). En concreto, se prefiere diseñar cebadores a partir de la comparación de regiones 5' y 3' no traducidas de alelos de la HLA (por ejemplo, alelos -A, -B, -C, -E, -F o -G), con selección de secuencias conservadas. Los sitios de restricción también pueden incorporarse en cebadores 5' y 3' para permitir que los productos de la amplificación fueran subclonados en vectores de secuenciación y expresión. También puede ser útil colocar un espaciador con una secuencia de 4-bases proximal al sitio de restricción para mejorar la eficiencia para cortar los productos de amplificación con enzimas.

Se prefirieron los siguientes cebadores para la amplificación del cADN de HLA-A, -B, -C, -E, -F y -G, preferiblemente en reacciones separadas. Los cADN resultantes pueden clonarse y secuenciarse a continuación tal como se describe en la presente invención. Estos cebadores son apropiados para su uso en amplificar todos los tipos de HLA conocidos y actualmente desconocidos.

HLA A

cebador 5' : 5' CC ACC ATG GCC GTC ATG GCG CCC 3'
(SEC N° ID 1)

cebador 3' : 5' GG TCA CAC TTT ACA AGC TCT GAG 3'
(SEC N° ID 2)

ES 2 272 611 T3

HLA B

5

cebador 5': 5' CC ACC ATG CTG GTC ATG GCG CCC 3'

10 (SEC N° ID 3)

cebador 3': 5' GG ACT CGA TGT GAG AGA CAC ATC 3'

(SEC N° ID 4)

15

HLA C

20

cebador 5': 5' CC ACC ATG CGG GTC ATG GCG CCC 3'

(SEC N° ID 5)

25

cebador 3': 5' GG TCA GGA TTT ACA AGC GAT GAG 3'

(SEC N° ID 6)

HLA E

30

35

cebador 5': 5' CC ACC ATG CGG GTA GAT GCC CTC C 3'

(SEC N° ID 7)

40

cebador 3': 5' GG TTA CAA GCT GTG AGA CTC AGA 3'

(SEC N° ID 8)

HLA F

45

50

cebador 5': 5' CC ACC ATG GCG CCC CGA AGC CTC 3'

(SEC N° ID 9)

55

cebador 3': 5' GG TCA CAC TTT ATT AGC TGT GAG 3'

(SEC N° ID 10)

60

65

HLA G

cebador 5': 5' CC ACC ATG GCG CCC CGA ACC CTC 3'

(SEC N° ID 11)

cebador 3': 5' GG TCA CAA TTT ACA AGC CGA GAG 3'

(SEC N° ID 12)

En una realización preferida, sólo un par de cebadores primero y segundo se usa por reacción de amplificación. A continuación se combinan los productos de la reacción de amplificación obtenidos a partir de una pluralidad de amplificaciones diferentes, cada una usando una pluralidad de pares cebadores diferentes. No obstante, la presente invención también contempla la producción de ADN homólogo a través de co-amplificación (usando dos pares de cebadores), y la amplificación múltiple (usando hasta aproximadamente 8, 9 o 10 pares cebadores).

El proceso de la PCR se usa no sólo para producir una variedad de moléculas de ADN que codifican la Clase I humana, sino también para inducir mutaciones que pueden emular aquéllas observadas en los locus altamente polimórficos del HLA, o para crear diversidad a partir de un único clon progenitor, y proporcionar por tanto una "biblioteca" de ADN codificando una molécula del MHC de la Clase I que tiene una mayor heterogeneidad. Primero, debería destacarse que el proceso de la PCR por sí mismo es inherentemente mutagénico, debido a una diversidad de factores bien conocidos en la técnica. Segundo, además de las variaciones inductoras de mutación descritas en la patente estadounidense n° 4.683.195 antes citada, pueden emplearse otras variaciones de la PCR inductoras de mutación. Por ejemplo, la mezcla de reacción de la PCR puede formarse con cantidades diferentes de uno o más nucleótidos a ser incorporados en el producto de extensión. Bajo tales condiciones, la reacción de la PCR procede para producir sustituciones de nucleótidos dentro del producto de extensión, a resultas de la escasez de un base determinada. Similarmente, pueden incorporarse en la mezcla inicial de reacción de la PCR cantidades molares aproximadamente iguales de los nucleótidos en una cantidad para realizar eficientemente un número X de ciclos, y a continuación ciclar la mezcla a través de un número de ciclos en exceso respecto X, tal como, por ejemplo 2X. Alternativamente, las mutaciones durante la PCR pueden inducirse mediante incorporación en una mezcla de reacción de derivados de nucleótidos, tales como inosina, que normalmente no se encuentran en los ácidos nucleicos de las variante de HLA que se está amplificando. Durante la subsiguiente amplificación *in vivo*, el derivado del nucleótido será remplazado por un nucleótido sustituto, induciendo por tanto una mutación localizada.

Un procedimiento preferido, el cual puede utilizarse para clonar una secuencia de nucleótidos que se pudiera expresar, que codificara el MHC de la Clase I humana, es como sigue. Puede cultivarse células que contuvieran el (los) gene(s) de elección en un medio apropiado (por ejemplo, RPMI 1640), suplementado según se precise (por ejemplo, con suero fetal bovino y/o antibiótico). Se prepara el ARN celular total a partir del cultivo de elección y a continuación se sintetiza el cADN de primera hebra. El cADN puede sintetizarse usando, por ejemplo, oligo(dT) y la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis de la aves. También puede usarse el radiomarcaje para asistir en el aislamiento y la recuperación del producto clonado. A continuación, el producto preferiblemente se extrae, se precipita, y se usa como diana para la PCR de amplificación, usando el par cebador de la PCR apropiado tal como se describe en esta. La amplificación puede llevarse a cabo usando procedimientos y equipos disponibles, por ejemplo, los equipos GeneAmp y un ciclador térmico (Perkin-Elmer/Cetus). También son útiles varios protocolos; un protocolo de amplificación progresa durante 30 ciclos, en los que cada ciclo consiste en 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 65°C, y 90 segundos a 72°C, seguidos por 10 minutos a 72°C. Otro protocolo progresa durante 20 ciclos, con 60 segundos a 94°C, un segundo a 65°C, y un tiempo variable a 72°C, el cual empieza a aproximadamente 50 segundos e incrementa gradualmente en un segundo en cada ciclo. La amplificación finaliza entonces con 10 minutos a 72°C.

Típicamente, el producto de la PCR se subclona a continuación y se secuencian de acuerdo con procedimientos conocidos. Por ejemplo, el producto puede extraerse y extraerse de nuevo (por ejemplo, con fenol/cloroformo), precipitarse, y digerirse con un enzima apropiado -por ejemplo, HindIII- durante un intervalo de tiempo apropiado. El producto doblemente cortado se aísla y purifica (por ejemplo, con cuentas de vidrio) y se liga a vectores igualmente cortados. A continuación se selecciona un vector apropiado en base a las características de la línea celular seleccionada para expresar la molécula del MHC. Por ejemplo, uno puede expresar el MHC en *E. coli* con el propósito de recuperar el MHC para su análisis secuencial. Alternativamente, uno puede expresar el MHC en una línea celular transformada de la presente invención con el propósito de activar células CD8. Por tanto, la selección de vectores apropiados se descubre con mayor detalle en otras partes en esta sección.

2. Vectores de expresión del ADN

Un vector de la presente invención es una molécula de ácido nucleico (preferiblemente ADN) capaz de replicación autónoma en una célula, y al cual puede unírsele operativamente un segmento de ADN (por ejemplo, un gen o poli-

nucleótido) para proporcionar la replicación del segmento unido. En la presente invención, uno de los segmentos de nucleótido a unir operativamente a las secuencias del vector, codifica al menos una parte de la molécula del MCH de la Clase I. Preferiblemente, la secuencia del gen del MHC que codifica el péptido se inserta entera en el vector y se expresa; no obstante, también es factible construir un vector que también incluya algunas secuencias no codificantes del MCH. Preferiblemente se excluyen las secuencias no codificantes del MHC. Otro vector preferido incluye una secuencia nucleotídica que codifica al menos una porción de una molécula microglobulina $\beta 2$ de mamífero unida operativamente al vector para su expresión. Es también posible construir un vector que incluya secuencias nucleotídicas que codifican ambas, la molécula del MHC de la Clase I y la microglobulina $\beta 2$.

Un vector preferido comprende un cassette que incluye una o más secuencias de ADN traducibles, unidas operativamente para su expresión a través de una secuencia de nucleótidos adaptada para la ligadura en una dirección. El cassette incluye preferiblemente secuencias de control de la expresión del ADN para expresar el polipéptido o proteína que se produce cuando una secuencia traducible de ADN se inserta en una dirección en el cassette a través de la secuencia de nucleótidos adaptadas para la ligadura en una dirección. El cassette también incluye preferiblemente una secuencia promotora cadena arriba respecto la secuencia traducible, y una secuencia de poliadenilación cadena abajo respecto la secuencia del MHC de mamífero. El cassette también puede incluir un marcador de selección, aunque se prefiere que tal marcador esté codificado en una secuencia nucleotídica operativamente unida a otra secuencia del vector de expresión.

Un vector de expresión se caracteriza porque es capaz de expresar, en un huésped compatible, un producto de un gen estructural, tal como un polipéptido del MHC de la Clase I humana, una microglobulina $\beta 2$, o ambas.

Tal como se usa en la presente invención, el término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar entre entornos genéticos diferentes otro ácido nucleico al cual ha sido unida operativamente. Los vectores preferidos son aquéllos capaces de replicación autónoma y de expresión de los productos de genes estructurales presentes en los segmentos de nucleótidos (ADN) a los que están unidos operativamente.

Tal como se usa en la presente invención, en relación a las secuencias o segmentos de ADN, la frase “operativamente unido” significa que las secuencias o segmentos han sido unidos covalentemente dentro de una pieza de ADN, no importa si en forma de hebra única o doble.

La elección del vector al que está unido operativamente un cassette depende directamente, como es bien sabido en la técnica, de las propiedades funcionales deseadas, por ejemplo, la replicación del vector y la expresión de la proteína, y de la célula huésped a ser transformada, siendo éstas limitaciones inherentes en la técnica de construcción de moléculas de ADN recombinantes.

En varias realizaciones, se utiliza un vector para la producción de polipéptidos útiles en los procedimientos de la presente invención, incluyendo variantes del MHC y péptidos antigénicos. Tales vectores se utilizan preferiblemente en conjunción con células “huésped” bacterianas adaptadas para la producción de cantidades útiles de proteínas o polipéptidos. Tales vectores pueden incluir un replicón eucariota, es decir, una secuencia de nucleótidos que tiene la capacidad de replicación directa autónoma y de mantener la molécula de ADN recombinante extra-cromosomalmente en una célula huésped procariota, tal como una célula huésped bacteriana, transformada con la misma. Tales replicones son bien conocidos en la técnica. Además, aquellas realizaciones que incluyen un replicón procariota pueden incluir también un gen cuya expresión confiere una ventaja selectiva, tal como la resistencia a drogas, a un huésped bacteriano transformado con el mismo. Los genes bacterianos típicos de la resistencia a drogas son aquéllos que confieren resistencia contra la ampicilina o tetraciclina. Los vectores típicamente contienen también sitios de restricción apropiados para la inserción de secuencias nucleotídicas traducibles. Los ejemplos de vectores incluyen los plásmidos pUC8, pUC9, pUC18, pBR322, y pBR329, disponibles en BioRad Laboratories (Richmond, CA), pPL y pKK223, disponibles en Pharmacia (Piscataway, NJ), y pBS y M13mp19 (Stratagene, La Jolla, CA). Otros ejemplos de vector incluyen el pCMU (Nilsson *et al.*, *Cell* 58: 707 (1989)). También pueden sintetizarse otros vectores apropiados, de acuerdo con procedimientos conocidos; por ejemplo, los vectores pCMU/K^b y PCMUII, usado en varias aplicaciones en la presente invención, son modificaciones del pCMUIV (Nilsson *et al.*, ver más arriba).

Una secuencia de nucleótidos adaptada para su ligadura en una dirección, es decir, un poliengarce, es una región del vector de expresión que (1) se une operativamente para la replicación y transporta las secuencias de nucleótidos de cadena arriba y cadena abajo, y (2) proporciona un sitio o medios para la ligadura en una dirección de una secuencia de nucleótidos dentro del vector. Típicamente, un poliengarce direccional es una secuencia de nucleótidos que define dos o más secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción, o sitios de restricción. A partir del corte de restricción, los dos sitios generan extremos adhesivos en los que puede ligarse una secuencia de nucleótidos traducible al vector de expresión. Preferiblemente, los dos sitios de restricción proporcionan, a partir del corte de restricción, extremos adhesivos que no son complementarios, y que permiten de ese modo la inserción en una dirección de una secuencia de nucleótidos traducible dentro del cassette. En una realización, los medios de ligación en una dirección son suministrados por los nucleótidos presentes en la secuencia de nucleótidos cadena arriba, la secuencia de nucleótidos cadena abajo, o ambas. En otra realización, la secuencia de nucleótidos adaptada para la ligación en una dirección comprende una secuencia de nucleótidos que define múltiples medios de clonación en una dirección. Cuando la secuencia de nucleótidos adaptada a la ligación en una dirección define numerosos sitios de restricción, se denomina como un sitio de clonación múltiple.

Una secuencia de nucleótidos traducible es una serie lineal de nucleótidos que proporciona una serie ininterrumpida, de al menos 8 codones, que codifican un polipéptido en una pauta de lectura abierta. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN. Además, preferiblemente hay una secuencia cadena arriba respecto de la secuencia de nucleótidos traducible que codifica una secuencia promotora. Preferiblemente, el promotor es condicional (por ejemplo, inducible). Un promotor condicional preferido usado en la presente invención es un promotor de metalotioneína o un promotor de choque térmico.

Los vectores se pueden construir utilizando cualquiera de las bien conocidas técnicas de construcción de vectores. Esas técnicas, no obstante, se modifican hasta el punto de que la secuencia de nucleótidos traducible a insertar en el genoma de la célula huésped está flanqueada, "cadena arriba" de la secuencia, por un promotor apropiado, y, en algunas variaciones de la presente invención, la secuencia de nucleótidos traducible está flanqueada "cadena abajo" por un sitio de poliadenilación. Esto es particularmente preferido cuando la célula "huésped" es una célula de insecto y la secuencia de nucleótidos se transmite a través de transfección. La transfección puede conseguirse a través de numerosos procedimientos, incluyendo el procedimiento del fosfato de calcio, el procedimiento del DEAE-dextrano, el procedimiento de transferencia estable, la electroporación, o a través del procedimiento de mediación de liposomas. Hay disponibles numerosos textos en los que se detallan procedimientos de transfección conocidos y otros procedimientos para introducir nucleótidos en las células, ver, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1991).

El vector por sí mismo puede ser de cualquier tipo apropiado, tal como un vector viral (ARN o ADN), una cadena lineal desnuda, o un ADN circular, o una vesícula o cubierta conteniendo el material de ácido nucleico y cualesquier polipéptidos que hayan de insertarse en la célula. Con respecto a las vesículas, las técnicas de construcción de vesículas lipídicas, tales como liposomas, son bien conocidas. Tales liposomas pueden apuntarse hacia células concretas usando otras técnicas convencionales, tales como proporcionar un anticuerpo, u otra molécula de unión específica, sobre el exterior del liposoma. Ver, por ejemplo, A. Huang *et al.*, *J. Biol. Chem.* 255:8015-8018 (1980).

Los vectores más útiles contienen múltiples elementos, incluyendo uno o más de los siguientes, dependiendo de la naturaleza de la célula "huésped" -es decir, la célula que está siendo transformada: (1) un origen de replicación del SV40 para la amplificación de un número elevado de copias; (2) un elemento promotor eficiente para el inicio de la transcripción a un nivel elevado; (3) señales para el procesamiento del ARN, tales como el corte del mRNA y secuencias de poliadenilación (y, frecuentemente, también secuencias intercaladas); (4) poliengargues que contienen múltiples sitio de restricción para endonucleasas para la inserción de ADN "ajeno"; (5) marcadores seleccionables que pueden usarse para seleccionar células que han integrado establemente el ADN del plásmido; y (6) secuencias de control de la replicación del plásmido para permitir la propagación en células bacterianas. Además de los anteriores, muchos vectores contienen también un sistema de expresión inducible que está regulado por un estímulo externo. Las secuencias de un cierto número de promotores que se requieren para la transcripción inducida han sido identificadas y diseñadas en vectores de expresión para obtener la expresión inducible. Varios vectores inducibles útiles se han basado en la inducción mediante interferón β , choque térmico, iones de metales pesados, y esteroides (por ejemplo, glucocorticoides). (Ver, por ejemplo, Kaufman, *Meth. Enzymol.* 185:487-511 (1990)).

En una realización preferida, el vector contiene también un marcador de selección. Después de su expresión, el producto de la secuencia nucleotídica traducible puede purificarse usando anticuerpos contra esa secuencia. Un ejemplo un marcador de selección es la resistencia a la neomicina. Un plásmido codificando la resistencia a la neomicina, tal como phshsneo, phsneo, o pcopneo, puede incluirse en cada transfección, de forma que una población de células que exprese el(los) gen(es) de elección puede discernirse haciendo crecer los transfectados en un medio de selección.

En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos traducible puede incorporarse en un plásmido con un promotor de transcripción controlable apropiado, secuencias de control de la traducción, y un poliengargue para simplificar la inserción de la secuencia nucleotídica traducible con la orientación correcta, y puede expresarse en una célula eucariota, tal como *Drosophila*, o en una célula procariota, tal como *E. coli*, usando técnicas convencionales. Preferiblemente, hay secuencias de control en 5' que definen un promotor para el inicio de la transcripción, y un sitio de unión de ribosomas operativamente unido al extremo 5' de la secuencia de ADN traducible ubicada cadena arriba. Para conseguir niveles de expresión génica elevados en células transformadas o transfectadas -por ejemplo, *E. coli*- es necesario usar no sólo promotores fuertes para generar grandes cantidades de mRNA, sino también sitios de unión de ribosomas para asegurar que el mRNA se eficientemente traducido. Por ejemplo, en *E. coli* el sitio de unión de ribosomas incluye también un codón de inicio (AUG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos de longitud ubicada 3-11 nucleótidos cadena arriba respecto el codón de inicio (Shine *et al.*, *Nature* 254:34 (1975)). La secuencia AGGAGGU, la cual se denomina secuencia Shine-Dalgarno (SD), es complementaria respecto el extremo 3' del mRNA de 16S de *E. coli*. La unión del ribosoma al mRNA y la secuencia en el extremo 3' del mRNA puede verse afectada por diversos factores, incluyendo (1) el grado de complementariedad entre la secuencia SD y el extremo 3' del tARN de 16S; y (2) el espaciado y la posibilidad de que la secuencia de ADN esté entre la secuencia SD y el AUG. (Ver, por ejemplo, Roberts *et al.*, *PNAS USA* 76:760 (1979a); Roberts *et al.*, *PNAS USA* 76:5596 (1979b); Guarente *et al.*, *Science* 209:1428 (1980); y Guarente *et al.*, *Cell* 20:543 (1980)). La optimización se consigue generalmente midiendo el nivel de expresión de los genes en plásmidos en los que este espaciado es sistemáticamente alterado. La comparación de mRNA diferentes muestra que hay secuencias estadísticamente preferidas a partir de las posiciones -20 a +30 (en donde la A de AUG está en la posición 0; ver, por ejemplo, Gold *et al.*, *Ann. Rev. Microbiol.* 35:365 (1981)). También se ha observado que las secuencias líder influyen dramáticamente la traducción (Roberts *et al.*, 1979a, b, ver más

arriba). La unión del ribosoma también puede verse afectada por la secuencia de nucleótidos que sigue al AUG, la cual afecta la unión del ribosoma. (Ver, por ejemplo, Taniguchi *et al.*, *J. Mol. Biol.* 118:533 (1978)).

Un vector que puede usarse de acuerdo con la presente invención incluye el promotor de choque térmico. Tales promotores son conocidos en la técnica; por ejemplo, ver Stellar *et al.*, *EMBO J* 4:167-171 (1985). Si se usa este promotor, también se prefiere añadir un sitio de poliadenilación.

Un vector preferido para su uso de acuerdo con la presente invención es un plásmido; más preferiblemente, es un plásmido con un elevado número de copias. También es deseable que el vector contenga una secuencia de promotor inducible, puesto que los promotores inducibles tienden a limitar la presión de selección contra las células en las que se han introducido tales vectores (los cuales se construyen a menudo para portar secuencias nucleotídicas no nativas o quiméricas). Es también preferible que el vector de elección sea apropiado para la expresión en el huésped escogido. Si la población de células huésped es un cultivo de células de *Drosophila*, entonces un vector compatible incluye vectores funcionalmente equivalentes a aquellos tales como el p25-lacZ (ver Bello y Couble, *Nature* 346:480 (1990)) o pRmHa-1, -2 ó -3 (ver Bunch *et al.*, *Nucl. Acids Res* 16:1043-1061 (1988)). En la realización preferida, el vector es el pRmHa-3, el cual se muestra en la Figura 1. Este vector incluye un promotor de metalotioneína, el cual está preferiblemente cadena arriba respecto al sitio en el que se inserta la secuencia del MHC, y el sitio de poliadenilación está preferiblemente cadena abajo respecto dicha secuencia del MHC. Las células de *Drosophila* son los huéspedes preferidos de acuerdo con la presente invención; en particular, las células de *Drosophila* tales como las células Schneider 2, que tienen los factores trans-actuadores necesarios requeridos para la activación del promotor, y son, por tanto, más preferidas incluso.

El vector de expresión pRmHa-3 se basa en el plásmido bacteriano pRmHa-1, el cual se basa en el plásmido pUC18 y está depositado en la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD), y tiene el número de acceso 37.253. El vector pRmHa-3 contiene el promotor, la secuencia líder 5' no traducida del gen de la metalotioneína (secuencias 1-421, SEC. N° ID 13) con los sitios R1 y Stu suprimidos; ver Figura 1C). También contiene la porción 3' del gen ADH de *Drosophila* (secuencia #6435-7270, SEC. N° ID 14), incluyendo el sitio de poliadenilación. Por tanto, el ADN clonado estará regulado transcripcionalmente por el promotor de la metalotioneína y poliadenilado. La construcción del plásmido pRmHa-1 se describe en Bunch *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16:1043-1061 (1988). La construcción de los plásmidos pRmHa-3 y pRmHa-2 (el último de los cuales tiene una secuencia del promotor de metalotioneína que puede suprimirse como un fragmento de EcoRI) se ilustra en la Figura 1A, B y C. Con respecto a pRmHa-3, un plásmido preferido para su uso de acuerdo con la presente invención, PstI, SphI y HindIII están en el fragmento promotor, y no son por tanto únicos. Xba está en el fragmento de ADH (4 bases a partir de su extremo 3') y tampoco es único. Los siguientes sitios de restricción son, no obstante, únicos en pRmHa-3: EcoRI, SacI, KpnI, SmaI, BamHI, SalI, HincII, y AccI.

Un cassette en un vector de expresión de ADN es la región del vector que forma, a partir de la inserción de una secuencia de ADN traducible, una secuencia de nucleótidos capaz de expresar, en un huésped apropiado, una proteína de fusión de esta invención. La secuencia de nucleótidos competente para la expresión se denomina "cistrón". Por tanto, el cassette preferiblemente comprende elementos de control de la expresión del ADN operativamente unidos a una o más secuencias traducibles de ADN. Un cistrón se forma cuando una secuencia traducible de ADN se inserta en una dirección (se liga en una dirección) entre los elementos de control a través de la secuencia de nucleótidos adaptada para este propósito. La secuencia de ADN traducible resultante, es decir, la secuencia insertada, está, preferiblemente, operativamente unida en la pauta de lectura apropiada.

Las secuencias de control de la expresión del ADN comprenden un conjunto de señales de expresión del ADN para expresar un producto del gen estructural, e incluyen tanto elementos 5' como 3', tal como es bien sabido, operativamente unidos al cistrón, de tal forma que el cistrón es capaz de expresar un producto de gen estructural. Las secuencias de control en 5' definen un promotor para iniciar la transcripción, y un sitio de unión de ribosomas operativamente unido al extremo 5' de la secuencia de ADN traducible ubicada cadena arriba.

Por tanto, un vector de expresión de ADN de esta invención proporciona un sistema para clonar secuencias de ADN traducibles en la porción del cassette del vector, para producir un cistrón capaz de expresar una proteína de fusión de esta invención.

3. Líneas celulares

Una línea celular preferida de la presente invención es capaz de crecer continuamente en cultivo, y es capaz de expresar moléculas del MHC de la Clase I de mamíferos sobre la superficie de sus células.

La línea celular es una línea celular de insecto. Hay disponibles varias líneas celulares para su uso de acuerdo con la presente invención, incluyendo la de polilla (ATCC CCL 80), la de oruga de polilla (ATCC CRL 1771), las de larva de mosquito (ATCC líneas CCL 125, CCL 126, CRL 1660, CRL 1591, CRL 6565, CRL 6586), y la del gusano de seda (ATCC CRL 8851). En una realización preferida, la línea celular es una línea celular de *Drosophila* tal como una línea celular de Schneider (ver, Schneider *et al.*, *J. Embryo. Exp. Morph.* 27:353-365 (1972)); preferiblemente, la línea celular es una línea celular Schneider 2 (S2/M3) adaptada a crecer en medio M3 (ver Lindquist *et al.*, *Drosophila Information Service* 58:164 (1982)).

Las células Schneider pueden prepararse sustancialmente como sigue. Se recogen huevos de *Drosophila melanogaster* a los largo de aproximadamente un intervalo de 4 horas y se suprime el corion en hipoclorito sódico acuoso al 2,5%, y se esteriliza su superficie mediante inmersión en etanol al 70% durante 20 minutos, seguida por 20 minutos adicionales en HgCl₂ al 0,05% en etanol al 70%. Después de aclararlos a conciencia en agua destilada estéril, se transfieren los huevos a placas de petri que contienen filtros negros Metrical estériles, soportados por prefiltros Millipore, ambos humedecidos previamente con medio cultivo. Se colocan los huevos durante la noche en un incubador a 22°C y se retiran para cultivarlos cuando tiene 20-24 horas de edad. Los embriones se cortan en mitades o tercios, se colocan a continuación en tripsina al 0,2% (1:250, Difco) en solución salina de Rinaldini (Rinaldini, *Nature (London)* 173:1134-1135 (1954)) durante 20-45 minutos a temperatura ambiente. Se usaron unos 100-300 embriones para iniciar cada cultivo.

Después de la adición del suero fetal bovino (FBS), se centrifugaron los fragmentos a 100 ×g durante 2-3 minutos, se resuspendieron en 1,25 ml de medio de cultivo, y se sembraron sobre frascos T-9 de vidrio. Los cultivos se mantuvieron a aproximadamente 22-27°C ± 0,5°C, con una fase gaseosa de aire ambiente. Preferiblemente se usó el medio de Schneider (Schneider, *J. Exp. Zool.* 156:91-104 (1964); Schneider, *J. Embryo. Exp. Morph.* 15:271-279 (1966)) conteniendo 500 mg adicionales de peptona bacteriológica por 100 ml de medio, y suplementado con un 15% de FBS inactivado. El pH (preferiblemente 6,7-6,8) se monitoriza con rojo de fenol al 0,01%. Las líneas celulares se mantienen preferiblemente subcultivándolas cada 3-7 días. Las células se unen fácilmente al vidrio, pero no tan firmemente como para requerir tratamiento con tripsina; típicamente, un sencillo pipeteado es adecuado para arrancar la mayoría de las células del fondo de los frascos. El aspecto morfológico de las células se describe en Schneider, *J. Embryo. Exp. Morph.* 27:353-365 (1972). Estas son esencialmente parecidas a epiteliales en su aspecto, y oscilan en aproximadamente 5-11 µm en diámetro y 11-35 µm de longitud. Puede haber pequeñas bolsas, conteniendo células redondeadas, dispersas aleatoriamente entre las otras células.

Preferiblemente, las células Schneider 2 se mantienen en medio de Schneider para *Drosophila* más un 10% de FBS, incluyendo penicilina (100 unidades/ml) y estreptomycin (100 mg/ml). Es preferible mantener las células en una densidad de más de $0,5 \times 10^5$ ml, y cultivarlas a un rango de temperaturas de 24-30°C. Las células tienden a duplicarse en menos de 24 horas, y crecen hasta una densidad elevada, por ejemplo, 2×10^7 /ml o superior. Las células también pueden congelarse en 90% de FBS y 10% de DMSO, para su uso o análisis posterior. Uno puede colocar las células a -70°C y almacenarlas a continuación en nitrógeno líquido.

Una línea celular preferida de acuerdo con la presente invención, identificada como células de Schneider 2, ha sido depositada, cumpliendo los requisitos del Tratado de Budapest, en la American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, el 18 de febrero de 1992, y se le asignó el número de acceso CRL-10.974.

La línea celular es una línea celular transformada capaz de expresar genes del MHC de la Clase I humana.

También se prefiere que la línea celular sea capaz de expresar la microglobulina β2 humana. Una línea celular aún más preferida es capaz de expresión estable o transitoria.

Puede utilizarse un vector para transformar/transfectar tal línea celular. Hay muchos vectores disponibles que pueden ser útiles en la transformación/transfección de líneas celulares; estos vectores se discuten con más detalle más arriba. No obstante, en resumen, en las realizaciones preferidas, las células de la presente invención se transfectan con cADN que codifican cadenas pesadas del MHC (humanas) y microglobulina β2, las cuales han sido insertadas en (es decir, se han unido operativamente a) un vector de expresión. En una realización más preferida, el vector comprende el plásmido pRmHa-3 de expresión en *Drosophila*, en el cual se han insertado secuencias nucleotídicas expresables codificando moléculas del MHC de la Clase I humanas o de la microglobulina β2 humana, usando técnicas descubiertas en la presente invención. Preferiblemente, los cADN que codifican el MHC y aquéllos que codifican la microglobulina β2 están operativamente unidos a plásmidos de expresión distintos, y se cotransfectan en las células cultivadas. Alternativamente, los cADN que codifican el MHC y la microglobulina β2 pueden estar operativamente unidos al mismo plásmido de expresión y cotransfectarse con el mismo plásmido. En otra variación, los cADN que codifican el MHC, la microglobulina β2, y una citoquina tal como la IL2, están operativamente unidos a plásmidos de expresión, y se cotransfectan en una línea celular de la presente invención. La selección de genes del HLA, la construcción de vectores apropiados, y la selección de cebadores, se describen con mayor detalle en las secciones B.1 y B.2 más arriba.

Las células exitosamente transformadas, es decir, las células que contienen una secuencia nucleotídica expresable de acuerdo con la presente invención, pueden identificarse mediante técnicas bien conocidas. Por ejemplo, las células resultantes de la introducción de un cADN o rADN de la presente invención pueden clonarse para producir colonias monoclonales. Las células procedentes de estas colonias pueden recolectarse, lisarse, y su contenido en ADN examinarse en busca de la presencia de rADN usando un procedimiento tal como el descrito por Southern, *J. Mol. Biol.* 98:503 (1975). Además de ensayar directamente en busca de la presencia de rADN, la transformación o transfección exitosa puede confirmarse mediante procedimientos inmunológicos bien conocidos cuando el rADN es capaz de dirigir la expresión de un polipéptido quimérico sujeto. Por ejemplo, las células exitosamente transformadas con un vector de expresión pueden producir proteínas que exhibieran propiedades antigénicas concretas, las cuales pueden determinarse fácilmente usando los antibióticos apropiados. Además, la transformación/transfección exitosa puede discernirse mediante el uso de un vector adicional portador de una secuencia marcadora, tal como la resistencia a la neomicina, tal como se describe en la presente invención más arriba.

Es también preferible que el cultivo sea capaz de crecimiento sostenido a temperaturas reducidas. Por ejemplo, se prefiere que el cultivo se mantenga a aproximadamente temperatura ambiente, por ejemplo, aproximadamente 24-27°C. En otras realizaciones, el cultivo se mantiene a temperaturas superiores, particularmente durante el proceso de activación de células CD8. Por tanto, se prefiere que un cultivo de acuerdo con la presente invención sea capaz de soportar una condición de temperatura de aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 37°C. La adición de microglobulina $\beta 2$ a un cultivo lo estabiliza al menos frente a la condición de 30°C; la adición de microglobulina $\beta 2$ y péptidos resulta en una mayor termoestabilidad a temperaturas más elevadas, es decir, a 37°C.

Por tanto, es aún más preferido que un línea celular de la presente invención sea capaz de lo siguiente: (1) crecimiento sostenido a temperaturas reducidas durante un período de tiempo predeterminado; (2) transformación mediante un vector de expresión; (3) expresión de microglobulina $\beta 2$; (4) expresión de uno o más tipos de moléculas del MHC de la Clase I; (5) cargar péptidos sobre las moléculas del MHC de la Clase I; y (6) expresar moléculas del MHC de la Clase I vacías sobre la superficie celular.

En una realización preferida de la presente invención, se establece un cultivo de células de *Drosophila* y se transfecta con vectores operativamente unidos a (1) una o más secuencias nucleotídicas que codifican moléculas del MHC de la Clase I, (2) a al menos una secuencia nucleotídica que codifica la microglobulina $\beta 2$ humana. Estas secuencias pueden estar operativamente unidas al mismo vector, pero preferiblemente, las secuencias para la microglobulina $\beta 2$ y para el MHC humano están en vectores separados. Para propósitos de selección, es también ventajoso transfectar la línea celular con un vector operativamente unido a un marcador de selección, por ejemplo, la resistencia a la neomicina. Subsiguientemente, se selecciona una población de células que expresan moléculas del MHC de la Clase I humana y microglobulina $\beta 2$, y se mantienen en cultivo.

Con objeto de preparar el cultivo para la expresión de moléculas del MHC vacías, o, más preferiblemente, cargadas con péptido, el cultivo puede requerir primero su estimulación, por ejemplo, a través de inducción con CuSO_4 , durante un período de tiempo predeterminado. Después de un período de inducción apropiado -por ejemplo, aproximadamente 12-48 horas, los péptidos pueden añadirse en una concentración predeterminada (por ejemplo, aproximadamente 100 $\mu\text{g/ml}$). Los péptidos pueden prepararse tal como se discute en la presente invención más adelante en la sección B.5. Después de un período de incubación adicional -por ejemplo, durante aproximadamente 12 a aproximadamente 27°C- el cultivo está listo para su uso en la activación de células CD8. Aunque este período de incubación adicional puede reducirse, o tal vez omitirse, nuestra observación es que el cultivo pasa a ser más estable frente a la condición de temperatura si se le permite incubarse durante un intervalo antes de la adición de células CD8 en reposo o precursoras. Por ejemplo, los cultivos de acuerdo con la presente invención, a los que se ha añadido péptido, son capaces de expresar cantidades significativas de moléculas del MHC de la Clase I cargadas con péptido incluso cuando se incuban durante períodos de tiempo prolongados a 37°C.

Los medios nutritivos útiles en el cultivo de células huésped transformadas son bien conocidos en la técnica y pueden obtenerse a partir de numerosas fuentes comerciales. En las realizaciones en las que la célula huésped es de mamífero, preferiblemente se usa un medio "libre de suero".

4. Microglobulina $\beta 2$ humana

Con objeto de establecer una línea celular capaz de producir cantidades terapéuticamente útiles de moléculas del MHC de la Clase I humanas expresadas sobre su superficie, es preferible co-transfectar una línea celular con un vector operativamente unido a una secuencia nucleotídica que codifique la microglobulina $\beta 2$, con objeto de efectuar los niveles de expresión apropiados de moléculas del MHC en la línea celular. Mientras que la secuencia nucleotídica que codifica la microglobulina $\beta 2$ de mamíferos, tal como la microglobulina $\beta 2$ de ratón, incrementa la estabilidad de las moléculas del MHC de la Clase I humana expresadas en las líneas celulares de la presente invención, es preferible co-transfectar la línea celular con un vector operativamente unido a una secuencia nucleotídica expresable que codifique una microglobulina $\beta 2$ humana. Tal como se discutió en la sección B.2 anterior, un vector preferido incluye una secuencia nucleotídica que codifica al menos una porción de la molécula de microglobulina $\beta 2$ humana operativamente unida al vector para su expresión. Es también posible construir un vector que incluya secuencias nucleotídicas codificando ambas, una molécula del MHC de la Clase I y una molécula de microglobulina $\beta 2$.

Ha sido publicada una secuencia de cADN de microglobulina $\beta 2$ humana (ver Suggs *et al.*, *PNAS* 78:6613-6617 (1981)), y se usó la secuencia como una plantilla para una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los siguientes cebadores:

cebador 5' :

5' GCT TGG ATC CAG ATC TAC CAT GTC TCG CTC
CGT GGC CTT AGC TGT GCT CGC GCT ACT CTC 3'
(SEC N° ID 15)

cebador 3' :

5' GGA TCC GGA TGG TTA CAT GTC GCG ATC

CCA CTT AAC 3'

(SEC N° ID 16)

Los cebadores se usan en una reacción estándar de la PCR (ver sección B.1 anterior y las referencias citadas en la misma). Los productos de la reacción se extrajeron con fenol, se purificaron usando un equipo Geneclean (Bio 101, San Diego, CA), se digirieron con BamHI y se clonaron en el sitio BamHI de pBS (Stratagene, La Jolla, CA). Después de verificar la secuencia, este fragmento BamHI se clonó en el sitio BamHI de un vector de expresión apropiado. En la realización preferida, se sintetizó el cADN de la microglobulina $\beta 2$ humana, y se unió operativamente al vector de expresión pRmHa-3.

5. Péptidos

Virtualmente todas las proteínas celulares, además de los antígenos virales, son capaces de ser usadas para generar fragmentos de péptidos relevantes que sirven como un ligando potencial de la Clase I. En la mayoría de las células de mamíferos, por tanto, cualquier complejo particular de péptido del MHC representaría sólo una pequeña fracción del total de moléculas codificadas del MHC encontradas sobre la superficie celular. Por tanto, con objeto de producir moléculas del MHC de la Clase I humanas, expresadas sobre la superficie, que tengan una capacidad incrementada para activar específicamente células CD8, es preferible aislar y cargar fragmentos de péptido, del tamaño y características antigénicas apropiadas, sobre moléculas de la Clase I.

Los péptidos de la presente invención se unen a moléculas del MHC de la Clase I. La unión ocurren en condiciones biológicas que pueden crearse *in vivo* así como *in vitro*. La naturaleza exacta de la unión de los péptidos no tiene porque conocerse para practicar la invención.

En una realización preferida, los péptidos a cargar sobre las moléculas de MHC de la Clase I son antigénicos. También se prefiere que los péptidos sean de un tamaño uniforme, preferiblemente de 8-meros ó 9-meros, y más preferiblemente, 8-meros. Es también preferible que los péptidos preparados para cargar sobre las moléculas de MHC sean de especies únicas; esto es, que todos los péptidos cargados sobre el MHC sean idénticos en tamaño y secuencia. De esta forma, es posible producir moléculas monoantigénicas de MHC cargadas de péptidos.

Los péptidos pueden presentarse sobre las células de varias formas. Preferiblemente, los péptidos se presentan en una forma que les permite entrar en un pool intracelular de péptidos. Los péptidos pueden añadirse al cultivo en forma de un polipéptido intacto o proteína, el cual es subsiguientemente degradado por procesos celulares, por ejemplo, mediante degradación enzimática. Alternativamente, le polipéptido intacto o proteína puede degradarse a través de algunos otros medios, tales como la digestión química (por ejemplo, con bromuro de cianógeno) o proteasas (por ejemplo, quimiotripsina) antes de su adición al cultivo celular. En otras realizaciones, los péptidos se presentan en segmentos más pequeños que pueden, o no, incluir secuencias de aminoácidos epitópicos.

En una realización preferida, se añade una cantidad suficiente de proteína(s) o péptido(s) al cultivo celular para permitir que las moléculas de MHC de la Clase I se usen y, subsiguientemente, presenten una gran densidad del péptido -preferiblemente, con el mismo tipo de péptido unido a cada MHC- sobre la superficie de células que están expresando el MHC de la Clase I humano. Es también preferido permitir que el MHC de la Clase I humano y la microglobulina $\beta 2$ se unan -por ejemplo, para formar heterodímeros- antes de presentar intracelularmente el péptido a las moléculas del MHC.

En otra realización de la invención, los péptidos se añaden a células transfectadas de la presente invención con objeto de mejorar la termoestabilidad de las moléculas del MHC expresadas por las células. Tal como se ha destacado más arriba, los péptidos se añaden preferiblemente al medio de cultivo. Los péptidos antigénicos que se unen a las moléculas de la Clase I sirven para termoestabilizar las moléculas del MHC, y también incrementan la expresión sobre la superficie celular. Los cultivos con péptidos añadidos que se unen a las moléculas del MHC son, por tanto, significativamente menos susceptibles a la condición de temperatura que los cultivos sin péptido añadido.

En una realización de la presente invención, los péptidos antigénicos se presentan a la línea celular transformadas/transfectadas en varias formas. Por ejemplo, puede degradarse química o enzimáticamente una proteína entera u otros polipéptidos antigénicos, y añadirse a la línea celular en esta forma. Por ejemplo, se degrada una proteína de interés con quimiotripsina, y la mezcla resultante de fragmentos de "péptidos" se añade a un cultivo de células transformadas o transfectadas; a continuación, se deja "escoger" a estas células los péptidos apropiados (los cuales son a menudo péptidos más pequeños, preferiblemente 8-meros ó 9-meros) a cargar sobre las moléculas del MHC de la Clase I. Alternativamente, puede clonarse un proteína entera o secuencia polipeptídica en un vector apropiado, e insertarse en una célula procariota, en donde la célula genera cantidades significativas del polipéptido transgénico, las cuales se recolectan a continuación, se purifican, y se digieren en péptidos, los cuales se añaden a continuación al cultivo de células eucariotas transformadas/transfectadas; de nuevo, se deja "escoger" a las células los péptidos a cargar sobre el MHC expresado.

6. Aislamiento de células CD8 en reposo o precursoras

Las células CD8 en reposo (o precursoras) -es decir, las células T que no ha sido activadas para apuntar a un antígeno específico- se extraen preferiblemente del paciente antes de la incubación de las células CD8 con los cultivos transformados. También se prefiere que las células CD8 precursoras se recolecten de un paciente antes del inicio de otro tratamiento o terapia que pudiera interferir con la capacidad de las células CD8 de ser activadas específicamente. Por ejemplo, si uno pretende tratar un individuo con una neoplasia o tumor, es preferible obtener una muestra de células y cultivarlas antes del inicio del tratamiento de quimioterapia o radiación.

Los procedimientos para extraer y cultivar linfocitos son bien conocidos. Por ejemplo, la patente estadounidense n° 4.690.915 de Rosenberg describe un procedimiento para obtener un número elevado de linfocitos mediante linfocitoféresis. Los condiciones de cultivo usadas son apropiadas para células de mamíferos, y se llevan a cabo típicamente a 37°C.

También hay varios procedimientos disponible para separar y/o enriquecer los cultivos de células CD8 precursoras. Algunos ejemplos de procedimientos generales para la separación de células incluyen la unión indirecta de células a superficies específicamente recubiertas. En otro ejemplo, los linfocitos de sangre periférica humana (PBL), los cuales incluyen células CD8, se aíslan mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Piscataway, NH). Los linfoblastos de PBL pueden usarse inmediatamente después, o pueden almacenarse en nitrógeno líquido, después de congelarlos con nitrógeno líquido en FBS conteniendo un 10% de DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo), lo que conserva la viabilidad celular y las funciones de linfocitos.

Los procedimientos alternativos de separación y/o enriquecimiento de cultivos de células precursoras incluyen el siguiente ejemplo. Después de preparar poblaciones de PLB enriquecidas en linfocitos a partir de sangre completa, las subpoblaciones de linfocitos CD8 se aíslan a partir de las mismas mediante técnicas de separación basadas en afinidad, dirigidas a la presencia del antígeno del receptor del CD8. Estas técnicas basadas en afinidad incluyen la microfluorimetría, incluyendo la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), la adhesión celular, y procedimientos similares. (Ver, por ejemplo, Scher y Mage, en *Fundamental Immunology*, Ed. W. E. Paul, pp. 767-780, River Press, NY (1984)). Los procedimientos de afinidad pueden utilizar anticuerpos anti-receptor de CD8 como la fuente de reactivo de afinidad. Hay varios anticuerpos monoclonales anti-células T y anti-CD8 disponibles de forma general, para su uso en estos procedimientos, a partir de una diversidad de fuentes comerciales, incluyendo la Americal Type Culture Collection (Rockville, MD) y Pharmigen (San Diego, CA). Dependiendo de la designación del antígeno, pueden ser apropiados diferentes anticuerpos. (Para una discusión y revisión de la nomenclatura, designación de antígenos, y anticuerpos asignados para leucocitos humanos, incluyendo células T, ver Knapp *et al.*, *Immunology Today* 10:253-258 (1989). Por ejemplo, en el catálogo de ATCC de líneas celulares e hibridomas (ATCC, Rockville, MD) se identifica que los anticuerpos monoclonales OKT4 (anti-CD4, ATCC n° CRL 8002), OKT5 (ATCC n° CRL 8013 y 8016), OKT8 (anti-CD8, ATCC n° CRL 8014), y OKT9 (ATCC n° CRL 8021) reaccionan respectivamente con los linfocitos T humanos, con subconjuntos de células T humanas, y células T activadas. Varios otros anticuerpos están disponibles para identificar y aislar especies de células T.

Preferiblemente, los PBL se purifican a continuación. Para este propósito pueden utilizarse, por ejemplo, gradientes de Ficoll. Los PBL purificados se mezclarían a continuación con células de *Drosophila* sinérgicas preincubadas con los péptidos antigénicos apropiados.

7. Activación *in vitro* de células CD8

Con objeto de optimizar las condiciones *in vitro* para la generación de células T citotóxicas específicas, el cultivo de células estimulantes se mantiene en un medio apropiado. En una realización preferida, las células estimulantes son células de *Drosophila*, las cuales se mantienen preferiblemente en un medio carente de suero (por ejemplo, Excell 400).

Antes de la incubación de las células estimulantes con las células a activar, por ejemplo, células CD8 precursoras, se añade una cantidad del péptido antigénico al cultivo celular estimulante, en cantidad suficiente para ser cargado sobre las moléculas de la Clase I humanas que se expresarán sobre la superficie de cada célula estimulante. Preferiblemente, las células estimulantes se incuban con > 20 µg/ml de péptido.

Las células CD8 en reposo o precursoras se incuban a continuación con las células estimulantes apropiadas durante un período de tiempo suficiente como para activar las células CD8. Preferiblemente, las células CD8 deberían, por tanto, activarse en una forma específica para antígeno. La proporción de células CD8 (efectoras) en reposo o precursoras respecto células estimulantes puede variar de individuo a individuo, y puede depender además de varias variables, tales como la docilidad de los linfocitos de un individuo a las condiciones de cultivo, y la naturaleza y gravedad de la condición morbosa u otra condición para la cual se usa la modalidad de tratamiento descrita en la presente invención. No obstante, preferiblemente la proporción de linfocito:célula estimulante (por ejemplo, célula de *Drosophila*) está en el rango de aproximadamente 30:1 a 300:1. Por ejemplo, en una realización se mezclaron 3×10^7 PBL humanos y 1×10^6 células de *Drosophila*, y se mantuvieron en 20 ml de medio de cultivo RPMI 1640.

El cultivo efector/estimulador puede mantenerse durante tanto tiempo como fuera necesario para estimular un número de células CD8 terapéuticamente usable o efectivo. En términos generales, el tiempo óptimo está entre uno

y cinco días, observándose generalmente una meseta (“plateau”) -es decir, un “máximo” específico para el nivel de activación de CD8- después de cinco días de cultivo.

8. Separación de células CD8 de células de *Drosophila*

Las células CD8 activadas pueden separarse efectivamente de las células estimulantes (por ejemplo, *Drosophila*) usando uno de una diversidad de procedimientos conocidos. Por ejemplo, pueden utilizarse anticuerpos monoclonales específicos para las células estimulantes, para los péptidos cargados sobre las células estimulantes, o para las células CD8 (o un segmento de las mismas) para unir su ligando complementario apropiado. Las moléculas marcadas con anticuerpos pueden extraerse a continuación a partir de la mezcla de células estimulantes-efectoras a través de medios apropiados, por ejemplo, mediante procedimientos de inmunoprecipitación o inmunensayo bien conocidos.

9. Administración de células CD8 activadas

La cantidades efectivas, citotóxicas de las células CD8 activadas pueden variar entre los usos *in vitro* e *in vivo*, así como con la cantidad y tipo de células que son la diana final de estas células asesinas. La cantidad también variará dependiendo de la condición del paciente, y debería ser determinada, mediante la consideración de todos los factores apropiados, por el practicante. No obstante, se usan preferiblemente de 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{12} , más preferiblemente de 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{11} , e incluso más preferiblemente de 1×10^9 a aproximadamente 1×10^{10} células CD8 activadas para humanos adultos, en comparación con las aproximadamente 5×10^6 a aproximadamente 5×10^7 usadas en ratón.

Preferiblemente, tal como se discutió más arriba, las células CD8 activadas se recolectan del cultivo de células de *Drosophila* antes de la administración de las células CD8 al individuo que se está tratando. No obstante, es importante notar que, a diferencia de otras modalidades de tratamiento actuales y propuestas, el presente procedimiento usa un sistema de cultivo celular (es decir, células de *Drosophila*) que no es tumorigénico. Por tanto, si no se consigue la completa separación de células de *Droso* y células CD8 activadas, no hay peligro inherente conocido asociado a la administración de un pequeño número de células de *Drosophila*, mientras que la administración de células promotoras de tumores puede ser extremadamente arriesgada.

Los procedimientos para introducir componentes celulares son conocidos en la técnica e incluyen procedimientos tales como aquéllos ejemplificados en la patente estadounidense nº 4.844.893 para Honsik *et al.*, y la patente estadounidense nº 4.690.915 para Rosenberg. Por ejemplo, la administración de células CD8 vía infusión intravenosa es apropiada.

10. Tipado del HLA

Tal como se ha destacado previamente, los haplotipos/alotipos del HLA varían de individuo a individuo, y, mientras que no es esencial para la práctica de la presente invención, a menudo es útil determinar el tipo de HLA del individuo. El tipo de HLA puede determinarse mediante procedimientos de tipado estándares, y los PLB pueden purificarse mediante gradientes de Ficoll. Los PBL purificados se mezclarían a continuación con células de *Drosophila* sinérgicas preincubadas con los péptidos antigénicos apropiados -por ejemplo, en aplicaciones terapéuticas relacionadas con infecciones virales, cánceres, o tumores malignos, péptidos derivados de proteínas específicas del cáncer o de virus.

Continuando con el uso de condiciones virales o malignas como ejemplo, en aquellas circunstancias en las que se han caracterizado péptidos específicos de un determinado antígeno viral o del cáncer, preferiblemente se usarán los péptidos sintetizados que codifican estos epítopos. En los casos en los que los péptidos antigénicos preferidos no se han determinado con precisión, pueden usarse digeridos de proteasas de proteínas específicas virales o del cáncer. Como una fuente de tales antígenos, el cADN que codifica proteínas específicas virales o tumorales se clona en un plásmido de expresión en bacterias, y se usa para transformar bacterias, por ejemplo, mediante procedimientos descubiertos en la presente invención.

Después del tipado del HLA, si no hay disponibles células de *Drosophila* que expresen el HLA preferido, los cADN que codifican el HLA preferido pueden clonarse a través del uso de la reacción en cadena de la polimerasa. Los cebadores descubiertos en la SECCIÓN B.1 anterior (SEC. ID nº 1 a SEC. ID nº 12) pueden usarse para amplificar los cADN de HLA-A, -B, -C, -E, -F, o ADN-G en reacciones separadas, las cuales pueden clonarse a continuación y secuenciarse tal como se ha descrito en los procedimientos descubiertos mas abajo para HLA A2.1. Las líneas celulares estables que expresan el HLA clonado pueden a continuación establecerse en las células de *Drosophila*. Alternativamente, para la activación de CD8 *in vitro*, puede usarse una población de células de insecto expresando transitoriamente una población a granel de moléculas clonadas recombinantes procedentes de la reacción de la PCR.

11. Mitógeno de *Drosophila*

Se ha encontrado que el sobrenadante procedente de células cultivadas de acuerdo con la presente invención aumenta o restablece la capacidad de las líneas celulares de generar células CD8 activadas específicas. La adición de aproximadamente un 10% de sobrenadante del cultivo de *Drosophila* a un cultivo de linfocitos, o a células fijadas, activa eficientemente las CD8. Las células cultivadas que expresan antígenos singénicos de la Clase I que no consiguieron

activar CD8 en cultivo primario, fueron capaces de generar CD8 específicas después de la adición de sobrenadante del cultivo de células de *Drosophila*.

Un factor aislado procedente del cultivo, el cual parece tener un impacto significativo sobre la activación de las CD8 en cultivos de células de *Drosophila* es el mitógeno celular de *Drosophila*. El mitógeno se caracteriza como una sustancia secretada soluble con una buena estabilidad, el cual mantiene su actividad incluso después de cuatro meses de almacenamiento a 4°C. El mitógeno tiene un peso molecular relativamente elevado -es decir, 500 kDa mediante filtración en gel Superose (Pharmacia, Piscataway, NJ). También se une intensamente a la Sepharose Mono Q (Pharmacia, Piscataway, NJ). El mitógeno de células de *Drosophila* aparentemente induce la proliferación de células B y activa los macrófagos.

El mitógeno hallado en *Drosophila* puede ser un ejemplo de otros mitógenos de insectos, y proporcionar un adyuvante terapéutico efectivo. Por ejemplo, pueden retirarse las células procedentes de un animal infectado y usarse para estimular subsiguientemente células de *Drosophila* mezcladas con linfocitos de sangre primarios y mitógeno de *Drosophila*. La mezcla puede usarse a continuación para el tratamiento del organismo.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos de pretende que ilustren pero no limiten, la presente invención.

Ejemplo 1

Expresión de moléculas del MHC de la Clase I humanas

A. Preparación del vector de expresión pRmHa-3

El vector de expresión pRmHa-3, para su uso en la expresión de proteínas del MHC en células Schneider 2 de *Drosophila* tal como se describe en esta invención, se construyó ligando el vector de expresión de ADN pRmHa-1, linealizado con SphI, con un fragmento de ADN resultante de una digestión con SphI del vector de expresión pRmHa-2 descrito más abajo. La ligación de esta manera del pRmHa-1 con el fragmento de pRmHa-2 se realizó para suprimir uno de los dos sitios de clonación para endonucleasa de restricción EcoRI presentes en el pRmHa-1. Por tanto, el vector de expresión pRmHa-3 resultante contenía sólo un sitio de restricción EcoRI en el sitio de clonación múltiple (poliengarce) en el que se insertaron varios fragmentos de ADN codificando MHC, tal como se describe en los Ejemplos.

1. Preparación del vector de expresión pRmHa-1

El vector de expresión pRmHa-1, conteniendo un promotor de metalotioneína, secuencias consenso de respuesta a metales (denominada MT), y un gen de la deshidrogenasa de alcohol (ADH) conteniendo un sitio de poliadenilación aislado a partir de *Drosophila melanogaster*, se construyó tal como describieron Bunch *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16:1043-1061 (1988). En la Figura 1B se muestra un esquema de la construcción final del pRmHa-1. El vector de expresión de plásmido, pUC18, que tiene el número de acceso 37.253 en ATCC, se usó como vector fuente a partir del cual se derivaron los diversos vectores descritos en la presente invención. El plásmido pUC18 contiene los siguientes sitios de restricción, de 5' a 3', en el sitio de clonación múltiple, todos los cuales no se ilustran en las representaciones esquemáticas de los vectores derivados del puc18 de la Figura 1: EcoRI; SacI; KpnI, SmaI y SmaI ubicados en la misma posición; BamHI; XbaI; SalI; AccI e HincII ubicados en la misma posición; PstI; SphI e HindIII. El vector puc18 se dirigió primero con HindIII para formar un puc18 linealizado. A continuación se crearon los extremos romos rellenando los extremos de HindIII con el fragmento grande de la polimerasa I de ADN, tal como describieron Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1982).

El vector puc18 de extremos romos, linealizado, se ligó con un fragmento HinfI de 740 pares de bases (p.b.) procedente del gen de la ADH de *Drosophila melanogaster*, que contiene un sitio de poliadenilación. El alelo de la ADH ligado se aisló primero a partir del plásmido pSACI, descrito por Goldberg *et al.*, *PNAS USA* 77:5794-5798 (1980), mediante digestión con el fragmento de HinfI, seguida por embotamiento de los extremos con Klenow, resultando en la secuencia nucleotídica listada en la SEC. N° ID. 14. El vector pSACI que contiene el alelo de la ADH se construyó subclonando en pBR322 (número de acceso en ATCC 31.344) un fragmento EcoRI de 4,7 kilobases (kb) del ADN de *Drosophila*, seleccionado a partir de una biblioteca del bacteriófago lambda que contenía fragmentos aleatorios de peso molecular elevado (superior a 15 kb). El sitio de restricción 5' HinfI ocurrió de forma natural en el gen de la ADH en la posición 1770, tal como describió Kreitman, *Nature* 304:412-417 (1983). El sitio 3' HinfI se derivó a partir del vector puc18 en el que se había clonado el gen de la ADH. Esta posición estaba 4 pares de base 3' respecto al sitio XbaI, en la posición 25.000 del gen de la ADH. El segmento de la ADH se extendía, desde los 35 p.b. cadena arriba de la secuencia de poliadenilación/corte en la porción 3' no traducida del mRNA de la ADH, hasta 700 p.b. cadena abajo respecto a la señal de poliadenilación. El vector derivado del puc18 resultante conteniendo el fragmento del gen de la ADH se denominó pHA-1 tal como se muestra en la Figura 1A.

El fragmento EcoRI/StuI de 421 p.b. del gen MT se obtuvo a partir de un clon que contenía ADN de aproximadamente 15,3 kb en una biblioteca de ADN genómico de *Drosophila melanogaster*. La biblioteca, preparada con una digestión parcial con MboI de ADN de imago, se clonó en el EMBL4 derivado de lambda. El fragmento contenía

el promotor de la MT y el elemento consenso de respuesta a metal del gen de la MT de *Drosophila* (Maroni *et al.*, *Genetics* 112:493-504 (1986)). Esta región, conteniendo el promotor y el inicio de transcripción en el nucleótidos +1, correspondía a la posición -370 a +54 del gen de la MT (SEC. N° ID. 13). El fragmento resultante se ligó entonces en el vector de expresión pHA-1 preparado más arriba, el cual se linealizó previamente con EcoRI y SmaI. El extremo romo 3' en MT, creado por la digestión con StuI, era compatible con el extremo romo en pHA-1, creado por la digestión con SmaI. El vector derivado de puc18 resultante, que contenía un fragmento 5' del gen de la MT de *Drosophila* y un fragmento 3' del gen de la ADH, se denominó pRmHa-1. El vector de expresión pRmHa-1, mostrado en la Figura 1B, contenía el origen de replicación (ori) y el gen de la beta-lactamasa, confiriendo resistencia a la ampicilina (Amp^r) procedente del puc18, tal como se muestra en la Figura 1A sobre el vector pHA-1. El diagrama de pRmHa-1 también muestra las posiciones 5' a 3' contiguas al fragmento del gen MT, el sitio de clonación múltiple, y el fragmento del gen de la ADH. El vector pRmHa-1 se usó tal como se describe en c., más abajo, en la construcción del vector de expresión pRmHa-3.

2. Preparación del vector de expresión pRmHa-2

La construcción del pRmHa-2 se muestra en la Figura 1A. Para la construcción del vector de expresión pRmHa-2, se insertó el fragmento MT preparado más arriba en el vector pHA-1, derivado de puc18, tal como se describió para la construcción del pRmHa-1 más arriba, con unas pocas modificaciones. Se añadió un engarce EcoRI al sitio StuI del fragmento del gen de la MT aislado mediante EcoRI/StuI, preparado más arriba, para formar un fragmento de metalotioneína que tenía sitios de restricción EcoRI en ambos extremos. El fragmento resultante se ligó a continuación en el vector de expresión pUC18 que contenía el fragmento de la ADH, el cual se linealizó previamente con EcoRI. El vector derivado de puc18 resultante, que contenía un fragmento 5' del gen de la MT de *Drosophila*, y un fragmento 3' del gen de la ADH, teniendo dos sitios de restricción EcoRI 5' respecto al sitio de clonación múltiple, se denominó pRmHa-2. El vector de expresión pRmHa-2, mostrado en la Figura 1A, contenía el origen de replicación (ori) y el gen de la beta-lactamasa, que confiere resistencia a la ampicilina (Amp^r), procedente del puc18. El diagrama de pRmHa-2 también muestra las posiciones contiguas 5' a 3' del fragmento del gen de la MT, el sitio de clonación múltiple, y el fragmento del gen de la ADH. El vector pRmHa-2 se usó tal como se describe en c., más abajo, en la construcción del vector de expresión pRmHa-3.

3. Preparación del vector de expresión pRmHa-3

Para preparar el vector de expresión pRmHa-3 que tenía sólo un sitio de restricción EcoRI, se ligó un fragmento procedente de pRmHa-2 en pRmHa-1. Para esta construcción, el pRmHa-2, preparado en b., más arriba, se digirió primero con SphI. El fragmento de SphI resultante, que empezaba en la mitad del gen de la MT y se extendía hasta el sitio SphI en el sitio de clonación múltiple, se aisló primero a partir del vector del pRmHa-2, y se ligó a continuación en el pRmHa-1 preparado en A.1., más arriba. El vector pRmHa-1 se había modificado previamente para suprimir el sitio de restricción EcoRI 5' respecto al fragmento del gen de la MT, linealizado a continuación con SphI. Este proceso se ilustra esquemáticamente en la Figura 1B. Para suprimir el sitio EcoRI en el vector pRmHa-1, se digirió primero el vector con EcoRI para formar un vector linealizado, a continuación se hicieron romos sus extremos con la nucleasa Mung Bean, y se religaron.

El vector pRmHa-1, carente de un sitio EcoRI, se digirió a continuación con SphI para suprimir la región correspondiente al fragmento SphI insertado, procedente de pRmHa-2, y formar un vector pRmHa-1 linealizado. El fragmento de SphI procedente de pRmHa-2 se ligó a continuación en el pRmHa-1, linealizado con SphI, para formar el vector de expresión pRmHa-3. En la Figura 1C se muestra un esquema del vector pRmHa-3. Las posiciones relativas de los diversos sitios de restricción procedentes del vector puc18, a partir del que se derivó el pRmHa-3, se indican en la figura. Además, se indican en la figura las posiciones relativas y longitudes de los fragmentos de gen de la MT y ADH, separados por el sitio de clonación múltiple (poliengarce) en el que se clona el gen del MHC de interés. El vector pRmHa-3, derivándose del vector puc18, contiene el origen de replicación (ori) del puc18, y el gen de la beta-lactamasa, que confiere resistencia a la ampicilina (Amp^r). Por tanto, los fragmentos de ADN codificando el MHC, tal como se preparan en esta invención y se clonan en el sitio de clonación múltiple del pRmHa-3, están transcripcionalmente regulados por el promotor de la MT y poliadenilados a través del gen de la ADH.

C. Síntesis del cADN

Para sintetizar el HLA A2.2., el cADN que codifica un A2.2 completo (ver, Holmes *et al.*, *J. Immunol.* 139:936-941 (1987), para las secuencias publicadas) se clona en un plásmido M13pm19, un vector de bacteriófago comercialmente disponible (Stratagene, La Jolla, CA). El cADN se sintetiza mediante PCR usando cebadores derivados a partir de la secuencia publicada de A2. El cADN se libera a partir de un clon M13mp19 como un fragmento NotI (voladizo relleno con Klenow)/EcoRI. (Los fragmentos Klenow son parte de la molécula de la polimerasa I de ADN de *E. coli*, producidos por tratamiento de la pol I de ADN de *E. coli* con subtilisina. Se usan para "rellenar" voladizos 5' o 3' en los extremos de moléculas de ADN producidos por nucleasas de restricción). El fragmento NotI/EcoRI se inserta en pSP64T digerido con BglIII (extremos rellenos con Klenow) y EcoRI. pSP64T es un vector de clonación SP6 diseñado para proporcionar regiones flanqueantes 5' y 3' procedentes de un mRNA, las cuales son eficientemente traducidas (β -globina) a cualquier cADN que contenga su propio codón de inicio. Este vector de traducción SP6 se construyó mediante la digestión de pSP64-X β m con Ball y BstEII, relleno de los extremos escalonados con polimerasa de ADN de T4, y añadiendo un engarce BglIII mediante ligación. El Ball corta el cADN de la β -globina dos bases cadena arriba respecto al ATG (codón de inicio), el BstEII corta ocho bases cadena arriba del TAA (codón de paro).

Hay un único gran sitio BglII en pSP64T, de forma que los enzimas de restricción que cortan en el fragmento poliengarce, desde PstI hasta EcoRI, pueden usarse todavía para linealizar el plásmido para su transcripción. (Ver Kreig y Melton, *Nucleic Acid Res.* 12:7057-7070 (1984), que también describen la construcción del plásmido pSP64-Xbm). El plásmido resultante se corta con EcoRI (extremo rellenado con Klenow) y HindIII, y se clona en el poliengarce de pCMUII entre HindIII (5') y StuI (3'). (Ver Paabo *et al.*, *EMBO J.* 5:1921-1927 (1986)). El cADN entero se suprimió como un fragmento HindIII (extremo relleno con Klenow)/BamHI, el cual se clonó en pRmHa-3 cortado con SmaI y BamHI.

El HLA A2.2 sol se preparó diseñando un codón de paro en el cADN de A2.2 descrito más arriba, precediendo inmediatamente al dominio transmembrana. La mutagénesis se consigue cortando el cADN de A2.2 clonado en el vector de expresi pCMUII entre HindIII 5' y StuI 3' (ver más arriba) con MboII y BamHI, insertando los siguientes oligonucleótidos:

cebador 5' : 5' GGAGCCGTGACTGACTGAG 3'
(SEC N° ID 17)

cebador 3' : 5' CCCTCGGCACTGACTGACTCCTAG 3'
(SEC N° ID 18)

Los plásmidos recombinantes resultantes se cortaron con HindIII, los voladizos finales se rellenaron con Klenow, a continuación se cortaron con BamHI, liberando un fragmento de restricción que se clonó en el pRmHa-3 de la misma forma que el A2.2 de longitud completa.

El cADN de HLA A2.1 se preparó como sigue. Se sintetizó una secuencia de cADN truncada de HLA A2.1, mediante PCR, usando los siguientes cebadores derivados a partir de la secuencia publicada del A2.1 (Koller y Orr, *J. Immunol.* 134:2727-2733 (1985)) y las condiciones de reacción descritas por Nilson *et al.*, *Cell* 58:707-718 (1989).

cebador 5' : 5' GCGGATCCATGGCCGTCATGGCGCCC 3'
(SEC N° ID 19)

cebador 3' : 5' CGGAATTCTCATCAGGGCTTCGGCAGCCC 3'
(SEC N° ID 20)

El fragmento de PCR resultante se clonó en pBS (Stratagene, La Jolla, CA), y la secuencia se verificó mediante secuenciación con dideoxi. Se cortó un fragmento de 800 p.b., codificando la mayoría de la secuencia codificante del HLA A2.1, a partir de este plásmido con Aval y StuI, y se usó para remplazar el mismo fragmento en la secuencia de transmembrana del HLA A2.2, la cual se había clonado previamente en el pRmHa-3 (ver más arriba).

El HLA B7 se sintetizó mediante la PCR usando cebadores derivados de la secuencia publicada del B7 (ver, por ejemplo, Zemmour y Parham, *Immunogenetics* 33:310-320 (1991)), flanqueada por sitios BamHI clonados directamente en el sitio BamHI de pRmHa-3 (Ver Sood *et al.*, *Immunogenetics* 22:101-121 (1988)).

El cADN de HLA B27 se sintetizó mediante la PCR usando cebadores derivados de la secuencia publicada del B27 (ver, por ejemplo, Zemmour y Parham, *Immunogenetics* 33:310-320 (1991)). Se proporcionan más detalles inmediatamente más abajo.

El cADN de HLA B27 sol se preparó como el cADN de B27 anterior, pero incorporando el codón de paro en el extremo del dominio alpha 3 del clon pBI (ver Szotz *et al.*, *PNAS USA* 83:1428 (1986)). Ambos cADN de B27, truncado y de longitud completa, se obtienen en el vector pDS5, con un extremo 5' modificado (ver Stueber *et al.*, *EMBO J.* 3:3143-3148 (1986)). Se realizó la mutagénesis dirigida contra un sitio para extender el extremo 5' del cADN. Se añadió la siguiente secuencia (en letras mayúsculas) al clon de cADN de B27 publicado; la secuencia después de la barra inclinada (/) es el inicio de la secuencia publicada:

GGATCCTCTCAGACGCCGAGATGCGGGTCACGGCGCCC/acggcgccc.. (SEC N° ID 21)

Los cADN del B27 completo y del B27 sol se cortaron del plásmido pDS5 cortando primero con ApaLI (extremo rellenado con Klenow) y BamHI. Los fragmentos resultantes se clonaron directamente en pRmHa-3 cortado con SalI (rellenado con Klenow) y BamHI.

Los cADN clonando cualquier HLA preferido pueden clonarse mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa. Los cebadores descritos en la sección B.1. anterior (SEC N° ID 1 a SEC. N° ID 12) pueden usarse para

amplificar los cADN de los HLA-A, -B, -C, -E, -F, o -G apropiados, en reacciones separadas, los cuales pueden clonarse a continuación y secuenciarse tal como se describió en los procedimientos descritos para HLA A2.1 más arriba. La preparación de cADN a partir de células humanas se realiza tal como se describe en Ennis *et al.*, *PNAS USA* 87:2833-2837 (1990). En resumen, se obtiene una muestra de sangre a partir de un individuo, y se recuperan las células después de su centrifugación, y se usan para preparar ARN total. Se sintetiza cADN de la primera hebra usando oligo (dT) y transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis de las aves. El cADN resultante se usa en una reacción de amplificación de la PCR utilizando el(los) cebador(es) apropiado(s) tal como se menciona en la sección B.1 anterior, y un equipo GeneAmp y un ciclador térmico (Perkin-Elmer/Cetus). Las condiciones de reacción son preferiblemente como sigue: se usan 100 ng de plantilla de cADN y 50 picomoles de cada cebador oligonucleotídico. Se corren treinta ciclos como sigue: (a) un minuto a 94°C; (b) un minuto a 60°C; y (c) un minuto, 30 segundos a 72°C. A continuación se calienta la reacción de la PCR hasta 100°C durante 10 minutos para destruir la polimerasa Taq, y se embotan los extremos del ADN mediante la polimerasa T4 (Stratagene, La Jolla, CA).

El cADN de la microglobulina $\beta 2$ humana se preparó usando una secuencia parcial de cADN publicada (ver Suggs *et al.*, *PNAS USA* 78:6613-6617 (1981)) como plantilla para una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los siguientes cebadores:

cebador 5' :

5' GCTTGGATCC AGATCTACCA TGTCTCGCTC CGTGGCCTTAG
CTGTGCTCGC GCTACTCTC 3'
(SEC N° ID 15)

cebador 3' :

5' GGATCCGGAT GGTTACATGT CGCGATCCCA CTTAAC 3'
(SEC N° ID 16)

Los cebadores se usan en una reacción de PCR estándar (ver Nilsson *et al.*, *Cell* 58:707 (1989)). Los productos de la reacción se extrajeron con fenol, se purificaron usando un equipo Geneclean (Bio 101, San Diego, CA), se digirieron con BamHI, y se clonaron en el sitio BamHI del pBS (Statagene, La Jolla, CA). Después de verificar la secuencia, este fragmento de BamHI se clonó en el sitio BamHI del pRmHa-3.

Tal como se destaca en los ejemplo, se utilizó el cADN de la Clase I de ratón en varios casos. El cADN de la Clase I de ratón se preparó como sigue.

H-2K^b: el cADN codificando una molécula de K^b completa se obtuvo a partir de un plásmido de expresión pMCU/K^b construido como sigue. Se preparó un cADN líder H-2K^b, que carecía de la secuencia líder y de la mayoría del dominio alpha I, de acuerdo con el procedimiento de Reyes *et al.*, *PNAS* 79:3270-3274 (1982), produciendo pH202. Este cADN se usó para generar una molécula de longitud completa. La secuencia ausente se proporciona usando un clon genómico que codifica el H-2K^b (Caligan *et al.*, *Nature* 291:35-39 (1981)) como plantilla en una reacción de PCR, usando un cebador 5' flanqueado por un sitio NotI, seguido por 21 nucleótidos que codifican los últimos siete aminoácidos de la secuencia líder, y 18 nucleótidos complementarios al inicio del dominio alpha I, y un cebador 3' complementario de la región que abarca el sitio StyI. El fragmento resultante se ligó con pH202 en el sitio StyI. La secuencia 50 que codifica el resto de la secuencia de señal se obtuvo a partir del cADN D^b (ver más abajo) como un fragmento BamHI/NotH. La secuencia codificante entera se cortó a partir del plásmido de expresión como un fragmento BamHI y se clonó en pRmHa-3 cortado con BamHI.

H-2L^d: el cADN codificando una molécula de L^d completa se obtuvo a partir de un plásmido de expresión pCMUIV/L^d (ver Joly y Oldston, *Gene* 97:213 (1991)). El cADN completo se cortó a partir del vector de expresión pCMUIV/L^d como un fragmento BamHI, y se clonó en pRmHa-3 como K^b.

H-2D^b: el cADN codificando una molécula de D^b completa se obtuvo a partir de un plásmido de expresión pCMUIV/D^b (ver Joly y Oldston, *Science* 253:1283-1285 (1991)). El cADN completo se cortó a partir del vector de expresión pCMUIV/D^b como un fragmento BamHI, y se clonó en pRmHa-3 como K^b.

Microglobulina $\beta 2$ de ratón: el cADN de la microglobulina $\beta 2$ de ratón de longitud completa se obtuvo como un fragmento HindIII (5') (rellenado con Klenow)/BglII (3') a partir del cADN de la microglobulina de ratón 132 de pSV2neo (ATCC n° 37.149), y se clonó en pRmHa-3 cortado con SmaI y BamHI.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el vector pCUM (pCUMIV) se deriva del vector de expresión en eucariotas pC18G como describen Nilsson *et al.*, ver más arriba. El vector pC81G, a su vez, se deriva de pA81G (Paabo *et al.*, *Cell* 33:445-456 (1983)) de acuerdo con el procedimiento descrito en (Paabo *et al.*, *EMBO J.* 5:1921-1927 (1986)). En resumen, estos tres vectores se construyeron como sigue.

La secuencias líder de 220 p.b. de longitud del vector pA81G se acortaron suprimiendo un fragmento de 80 p.b. HindIII a Ddel (nt 1286-1366 de la secuencia publicada por Herisse *et al.*, *NAR* 8:2173-2192 (1980)); esta construcción se denominó pB81G. Un fragmento HinfI del gen de la alfa-globina, abarcando la región desde nt -112 hasta +19 con respecto el sitio de inicio de la transcripción, se subclonó en el sitio PstI del pUC9, y el potenciador de la repetición de 72 p.b. del SV40 se insertó cadena arriba respecto el promotor. Este elemento potenciador-promotor se ensayó primero clonándolo en frente de la región que codifica el antígeno de SV40, y la construcción resultante se transfeció en células HeLa (ATCC CCL 185). Se fijaron las células transcurridos dos días, y se tiñeron en busca de antígeno T mediante inmunofluorescencia indirecta. Se halló un número elevado de núcleos teñidos, indicando una intensa actividad del promotor del fragmento de la alfa-globina. A continuación se remplazó el promotor del SV40 en el vector pB81G por este eficiente elemento promotor conduciendo a la construcción de pC81G.

pCMUIV se construyó digiriendo el pC81G con HindIII y BamHI, e insertando oligonucleótidos codificando la secuencia 5' no traducida del cADN de la β -globina de *Xenopus laevis*, usado para genera el pSP64T (Krieg *et al.*, *NAR* 12:7057-7070 (1984)). No obstante, se escogió el sitio BamHI en vez del sitio BglII usado en pSP64T. La secuencia insertada entre el HindIII y BamHI del pC81G fue:

```

5 '   AGCTTGAGCA   CTTGTTCTTT   TTGCAGAAGC   TCAGAATAAA
      CGCTCAACTT   3 '
      (SEC N° ID 22)

```

El vector phshsneo confiere resistencia a la neomicina (G418), y es un derivado del phsneo (pUCHsneo) con una secuencia adicional del promotor de choque térmico (hs), la cual puede sintetizarse, a partir de pUC8 comercialmente disponibles, tal como se describe en Steller *et al.*, *EMBO J.* 4:167 (1985). El promotor de choque térmico contenido en estos vectores es el promotor hsp70. Otros vectores útiles que confieren resistencia a la neomicina (resistencia G418) incluyen el vector cósmido smart2 (ATCC 37.588), el cual se expresa bajo el control del promotor hsp70 de *Drosophila*, y el vector de plásmido pcopneo (ATCC 37.409).

30 C. Inserción de genes en vectores de expresión

Los productos de restricción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa al 1% (Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor (1982)). Los fragmentos de restricción codificando los cADN se cortaron a partir del gel, y se purificaron de la agarosa usando "GeneClean" de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Bio 101, San Diego, CA). El plásmido de expresión de *Drosophila* pRmHa-3 (ver Bunch *et al.*, *Nucl. Acid Res.* 16:1043-1061 (1988)) se cortó con los enzima de restricción apropiados en tampón One Phor All de acuerdo con las indicaciones del fabricantes (Pharmacia, Piscataway, NJ), y se trataron con fosfatasa alcalina tal como se describe en la literatura del fabricante (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Cien ng del vector pRmHa-3 cortado y "fosfatado" se mezclaron con 300 ng de cADN de la cadena pesada el MHC de la Clase I purificada en gel de agarosa o cADN de microglobulina $\beta 2$, y se ligaron usando la ligasa de ADN de T4 y tampón One Phor All tal como se describe en la literatura del fabricante. Después de su incubación a 16°C durante cinco horas, se usó la mezcla de ligación para transformar *E. coli* JM83 competente (Maniatis *et al.*, ver más arriba (1982)).

Los procedimientos descritos por Maniatis *et al.*, ver más arriba, se usaron para preparar el cADN necesario; en resumen, los procedimientos son como sigue. Los transformantes se seleccionaron sembrando *E. coli* sobre placas de agar que contenían ampicilina. Las colonias resistentes a la ampicilina se cultivaron individualmente en cultivo líquido, y se preparó el ADN usando el procedimiento miniprep de lisis alcalina. La presencia de cADN de la cadena pesada de MHC, y su orientación en el vector, se determina mediante mapado de restricción. Las bacterias que contenían el vector con el cADN en la orientación correcta relativa al promotor de la metalotioneína se usaron para la preparación a gran escala de ADN usando el procedimiento de lisis alcalina y purificación en gradiente de cloruro de cesio. La cantidad de ADN obtenida se determinó espectrofotométricamente.

D. Transfección y marcaje de células Schneider

La células Schneider II se cultivan en medio Schneider (Gibco/BRL, Grand Island, NY) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (tratado con calor durante una hora a 55°C), 100 unidades/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin, y glutamina 1 mM. (Por conveniencia, este medio suplementado se denomina a partir de ahora como medio de Schneider). Las células se cultivaron a 27°C, y se pasaron típicamente cada siete días mediante dilución 1:17 en medio fresco. Las células se convirtieron a crecimiento en medio libre de suero (Excell 400 ó 401, suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin, glutamina 1 mM, y 500 μ g/ml de G418 (JRH Biosciences, Lenexa, KS), mediante dilución inicial al 50% de Schneider/50% de Excell 401. Una semana más tarde, las células pueden pasarse a 10% de medio Schneider/90% de Excell 401, y una semana más tarde a 100% de Excell 401. Las células se mantuvieron en este medio y se pasaron cada siete días diluyéndolas 2:17 en medio fresco.

Se sembraron 15×10^6 células Schneider a una concentración de 10^6 células por ml en placas de petri de 85 mm. Doce horas más tarde, se añadieron precipitados de fosfato/ADN, preparados como se describe más abajo (1 ml), gota a gota, a las células. Después de 48 horas, se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se transfirieron las células a un frasco de 175 cm² en un volumen total de 50 ml en medio de Schneider que contenía 500 μ g/ml de Geneticin (G418)

(Gibco/BRL, Grand Island, NY). Transcurridos 21 días, se retiraron 20 ml de cultivo a un frasco nuevo que contenía 30 ml de medio de schneider conteniendo 500 $\mu\text{g/ml}$ de G418. Diez días más tarde, se obtuvo una población estable de células que se adherían débilmente al frasco y crecían con una velocidad de duplicación de aproximadamente 24 horas, y estas células se cultivaron subsiguientemente y se pasaron en el medio de selección tal como se describe más arriba. Se prepararon alícuotas congeladas de estas células recolectando $5-20 \times 10^6$ células mediante centrifugación y resuspendiéndolas en 1 ml de medio de congelación de células (93% de suero fetal bovino/7% dimetilsulfóxido). A continuación de colocaron las alícuotas a -70°C durante una semana y subsiguientemente se transfirieron para almacenamiento en nitrógeno líquido.

Los precipitados de fosfato cálcico se prepararon tal como describieron Paabo *et al.* (*EMBO J.* 5:1921-1927 (1986)), excepto que se usaron 25 μg de ADN por transfección. Las siguientes combinaciones de ADN se usaron para preparar los transfectantes indicados:

(a) cadena pesada del MCH de la Clase I sola: 23 μg del ADN del vector de expresión de la cadena pesada + 2 μg de ADN de phshsneo.

(b) cadena pesada del MCH de la Clase I + microglobulina $\beta 2$: 11,5 μg del ADN del vector de expresión de la cadena pesada + 11,5 μg de microglobulina $\beta 2$ (humana o de ratón) + 2 μg de ADN de phshsneo.

Veinticuatro horas antes del marcado metabólico, se sembraron las células a una densidad celular de $3-5 \times 10^6$ células/ml (10 ml/placa de petri de 85 mm) en medio Schneider que contenía CuSO_4 1 mM. Treinta minutos antes del marcado, se aspiró el medio de las placas y se lavaron las células con 2×10 ml de PBS, y se incubaron a continuación en medio Grace para insectos, menos la metionina y cisteína (pedido especial a Gibco/BRL, Grand Island, NY), durante 20 minutos, y entonces en 1 ml de este medio conteniendo 0,1 mCi de 35S Trans marcado (New England Nuclear; duPont, Boston, MA). Después del período de marcado, se aspiró la solución de marcado, y las células, o se lisaron inmediatamente sobre hielo, con PBS/Triton X100 al 1% enfriado en hielo (1 ml), o después de un período de caza en presencia de medio Schneider o Excell 400 conteniendo metionina (5 ml) (JRH Biosciences). El medio de caza se recolectó si se estaban analizando moléculas del MHC de la Clase I solubles.

Todas las operaciones siguientes se realizaron con los lisados mantenidos fríos (menos de 8°C). Los lisados se recolectaron en tubos Eppendorf, se centrifugaron en un tubo de microfuga durante 15 minutos a $13.000 \times g$, se transfirieron a un tubo nuevo que contenía 100 μl de una papilla al 10% de proteína A Sepharose, y se colocaron en un rotador de extremo a extremo durante dos horas. A continuación de una centrifugación adicional en la microfuga durante 15 minutos, los lisados de células estaban listos para su análisis.

En los experimentos que utilizaban MHC de ratón, se transfectaron células de Schneider 2 con los recombinantes del MHC de ratón descritos más arriba usando el procedimiento de precipitación en CuSO_4 ; cada cadena pesada se transfectó bien sola o como una mezcla 50:50 con el vector que codificaba la microglobulina $\beta 2$. En cada transfección se incluye un plásmido que codifica la resistencia a la neomicina, ADN phshsneo, de forma tal que pudo obtenerse una población de células que expresaba establemente el MHC de la Clase I mediante el cultivo de los transfectantes en medio de selección (Geneticin G418-sulfato, Gibco/BRL, Grand Island, NY).

E. Generación del péptido

Los péptidos antigénicos de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse a partir de fuentes que existen naturalmente o puede sintetizarse usando procedimientos conocidos. En varios ejemplos discutidos en esta, los péptidos se sintetizan en un sintetizador Applied Biosystems, ABI 431A (Foster City, CA), y se purifican subsiguientemente mediante HPLC. Los péptidos antigénicos usados en varios experimentos descubiertos en la presente invención incluyen aquéllos listados mas abajo:

Ovoalbúmina (8)¹

Código de 1 letra: SIINFEKL;

Código de 3 letras: Asp Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln
Gly Leu

(SEQ. ID. N° 23) (residuos 5-12)

Ovoalbúmina (24)¹

Código de 1 letra: EQLSIINFEKLTEWTSSNVMEER;

Código de 3 letras: Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn

ES 2 272 611 T3

Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr
Ser Ser Asn Val Met Glu Glu Arg

5 (SEQ. ID. N° 23)

VSV NP²

10 Código de 1 letra: RGYVYQGL

Código de 3 letras: Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
(SEQ. ID. N° 24)

15

NP de la gripe²

20 Código de 1 letra: ASNENMETM

Código de 3 letras: Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr
Met

25 (SEQ. ID. N° 25)

NP de LCMV³

30 Código de 1 letra: SERPQASGVYMGNL

Código de 3 letras: Ser Glu Arg Pro Gln Ala Ser Gly
Val Tyr Met Gly Asn Leu

35 (SEQ. ID. N° 26)

GP2 de LCMV⁴

40 Código de 1 letra: DSSGVENPGGYCTK

Código de 3 letras: Asp Ser Ser Gly Val Glu Asn Pro
Gly Gly Tyr Cys Thr Lys

45 (SEQ. ID. N° 27)

GAG A de VIH (9)⁵

50 Código de 1 letra: EMKDCTERQ

Código de 3 letras: Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg
Gln

55 (SEQ. ID. N° 28)

GAG B de VIH (9)⁵

60 Código de 1 letra: KRWIILGLN

65

ES 2 272 611 T3

Código de 3 letras: Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu
Asn

5 (SEQ. ID. N° 29)

Vpr de VIH (9)⁵

10 Código de 1 letra: FRIGCRHSR

Código de 3 letras: Phe Arg Ile Gly Cys Arg His Ser
Arg

15 (SEQ. ID. N° 30)

POL de VIH (9)²

20 Código de 1 letra: ILKEPVHGV

Código de 3 letras: Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly
Val

25 (SEQ. ID. N° 31)

30 Matrix INF (10)⁶

Código de 1 letra: ILFGVFTLTV

Código de 3 letras: Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
Thr Val

35 (SEQ. ID. N° 32)

40 ¹ Carbone, et al., J. Exp. Med. 169: 603-12 (1989)

² Van Bleek, et al., Nature 348: 213-216 (1990)

45 ³ Witton, et al., J. Virol, 63: 4303-10 (1989)

⁴ Oldstone, et al., J. Exp. Med. 168: 559-570
(1988)

50 ⁵ Nixon and Mcmichael, AIDS 5: 1049 (1991); véase
también Nixon, et al., AIDS 4: 841-5 (1990).

⁶ Gotch, et al., J. Exp. Med. 168: 2045-57 (1988).

55 El aislamiento o síntesis de péptidos "aleatorios" también pueden ser apropiados, particularmente cuando uno
está intentando discernir un epítipo concreto con objeto de cargar una molécula de MHC vacía con un péptido lo
más probable para estimular células CD8 precursoras. Uno puede producir una mezcla de péptidos "aleatorios" a
través del uso de proteosomas (ver, por ejemplo, el Ejemplo 2.B.6), o sometiendo una proteína o polipéptido a un
60 proceso de degradación -por ejemplo, digestión con quimiotripsina- o pueden sintetizarse péptidos. Mientras que
hemos observado que las líneas celulares de la presente invención son capaces de degradar proteínas y polipéptidos
en péptidos más pequeños capaces de ser cargados sobre moléculas del MHC de la Clase I humana, es preferible
introducir péptidos más pequeños -por ejemplo, 8-meros y 9-meros- directamente en el cultivo celular para facilitar
un carga y proceso de expresión más rápidos.

65 Si uno está sintetizando péptidos, por ejemplo, péptidos aleatorios de 8-, 9- y 18-aminoácidos, todas las variedades
de aminoácidos se incorporan preferiblemente durante cada ciclo de la síntesis. No obstante, debería notarse que

varios parámetros -por ejemplo, incompatibilidad de solvente de ciertos aminoácidos- pueden resultar en una mezcla que contiene péptidos que carecen de ciertos aminoácidos. Por tanto, el proceso debería ajustarse según se precise -es decir, alterando los solventes y condiciones de reacción- para producir la mayor variedad de péptidos.

Con objeto de determinar las “preferencias” en la selección de péptidos mediante moléculas del MHC, se han sintetizado, por tanto, una serie de péptidos de diferentes longitudes, tal como se muestra en la Tabla 3. Estos incluyen péptidos de 8 y 9 aminoácidos de longitud, así como péptidos más largos. Con objeto de cuantificar la cantidad de termoestabilidad conferida por péptidos de diferente longitud y por diferentes microglobulinas $\beta 2$, se ha examinado la estabilidad de estas diversas moléculas en los lisados de células. Los lisados radiactivos de células se prepararon a partir de células de *Drosophila* que expresaban $K^b/\beta 2$, $L^d/\beta 2$, y $D^b/\beta 2$, bien con microglobulinas $\beta 2$ de ratón o humana, tal como se ha descrito previamente. Los lisados se alicuotaron a continuación y se hicieron adiciones según se describe. Para cada tratamiento, se prepararon cinco tubos; estos se incubaron a continuación a diferentes temperaturas entre 4°C y 47°C durante una hora, transcurrida la cual se inmunoprecipitó la Clase I y se analizó mediante SDS-PAGE. A continuación, se escanearon los autoradiogramas usando un densitómetro de láser, y la cantidad de señal se representó frente a la temperatura de la incubación a la que se había sometido la muestra. Se calculó la temperatura a la que el 50% de las moléculas eran estables a partir del gráfico, y se usó como una medición de las termoestabilidades relativas de las diferentes especies. Tal como se ha destacado en la presente invención más arriba, la cadenas pesadas de ratón complejadas con microglobulina $\beta 2$ humana fueron estables a temperaturas aproximadamente 6-8 grados superiores que si se complejaban con $\beta 2$ de ratón. También se observó que las estabilidades impartidas por el péptido y la microglobulina $\beta 2$ xenogénica eran aditivas. Un gran incremento en la termoestabilidad de las moléculas de la Clase I tiene lugar si se usan 8-9-meros en comparación con 12-25-meros; más aún, la diferencia entre la estabilización impartida por los 8-9-meros comparada con los péptidos mayores puede ser incluso mayor que la observada previamente, porque, aunque los péptidos se han purificado mediante HPLC, es probable que haya cierta contaminación de los péptidos mayores con 8-9-meros.

Se muestra ahora que la termoestabilidad de una molécula de la Clase I depende aparentemente de: (1) el origen de la microglobulina $\beta 2$; (2) la presencia de péptido; y (3) la longitud y secuencia de este péptido.

F. Generación de MHC termoestable expresado en superficie

1. Refinando los parámetros usando MHC de ratón

Antes de la experimentación con células expresando moléculas del MHC de la Clase I humana, se realizó la optimización de varios parámetros usando MHC de ratón. Primero se verificó que las moléculas del MHC de la Clase I de ratón expresadas en células de *Drosophila* tenían las características de las moléculas de Clase I “vacías” o libres de péptido.

Por ejemplo, las Figuras 2A y B ilustran resultados de ensayos preparados a partir de células de *Drosophila* que expresaban $K^b/\beta 2$, $L^d/\beta 2$, y $D^b/\beta 2$, con microglobulina $\beta 2$ humana o de ratón. Se marcaron células de *Drosophila* que expresaban $K^b/\beta 2$, $L^d/\beta 2$, y $D^b/\beta 2$ durante 45 minutos con 35S metionina, y se prepararon lisados tal como se describe más arriba. Cada lisado se dividió en cuatro alícuotas, a las que se añadió OVA, o péptido NP o GP2, o ningún péptido en absoluto. Después de su incubación durante una hora a 4°C, se incubó la otra durante una hora a 30°C. A continuación se inmunoprecipitaron las moléculas de la Clase I a partir de lisados, y se analizaron mediante SDS-PAGE. Ocurrió una dramática estabilización $K^b/\beta 2$ respecto el desafío de temperatura cuando se añadieron OVA o péptido NP a los lisados; similarmente, la $L^d/\beta 2$ fue estabilizada por la adición de péptido NP. La $D^b/\beta 2$ no parece ser tan lábil a la temperatura como las otras dos moléculas; sin embargo, se observa un incremento en la estabilidad de la molécula a partir de la adición del péptido GP2 al lisado, mientras que la adición de OVA o péptido NP no lo consigue. Pueden observarse dos bandas inmunoprecipitadas para cada Clase I, representado las formas procesadas en Golgi (inferior) o no procesada (superior), ambas moléculas parecen ser estabilizadas igualmente bien mediante la adición de péptido al lisado. La pequeña cantidad de proteína “resistente a 30°C” observada en la $K^b/\beta 2$ no tratada o en lisados de GP2 es señal de fondo, puesto que la adición de Y3 a un lisado de células marcadas con $L^d/\beta 2$ resultó en el aislamiento de esta banda (no se muestra).

A continuación, se investigó la posibilidad de que la microglobulina $\beta 2$ humana fuera mejor que la microglobulina $\beta 2$ de ratón para estabilizar las cadenas pesadas de ratón. Se encontró que la adición de la $\beta 2$ humana a células de *Drosophila* creciendo en medio Excell 400 no tan sólo incrementaba el nivel de estadio estacionario de las tres moléculas de la Clase I de ratón, también hacía a las moléculas estables a 37°C durante tres horas. La estabilidad incrementada de la Clase I de ratón a partir de la adición de la $\beta 2$ humana pudo haber sido el resultado de incrementar la concentración de $\beta 2$ en el medio; esta posibilidad se descartó. Se clonó cADN de la microglobulina $\beta 2$ humana en el vector pRmHa-3 de expresión en *Drosophila*, y se cotransfectó con plásmidos de expresión que contenían los diversos cADN de la cadena pesada de la Clase I de ratón y el plásmido marcador de la resistencia, tal como se describió previamente. Después de su selección con G418, se tiñeron las células con los anticuerpos anti-Clase I apropiados para la expresión sobre superficie, se seleccionaron las células que expresaban intensamente usando la FACS. Se obtuvieron poblaciones estables de células (no se muestran los datos). A continuación se condicionaron las células a crecer en Excell 400, y se incubaron durante diferentes períodos de tiempo a 37°C. Las moléculas de la Clase I de ratón sintetizadas con la microglobulina $\beta 2$ humana fueron estables a una incubación de 3 horas a 37°C sin la adición de $\beta 2$ exógena al medio Excell (no se muestran los datos). Nuestros resultados indican que la termoestabilidad de las moléculas de la Clase I de ratón depende de la presencia de péptido y del origen de la microglobulina $\beta 2$. (Ver Figuras 3A y 3B).

Además, se ha determinado ahora que las moléculas de la Clase I expresadas sobre la superficie celular son estabilizadas aún más por la adición de péptidos del tamaño apropiado. (Ver Figuras 5A-C). Se sintetizaron una serie de péptidos de diferentes longitudes, tal como se muestra en la Tabla 3 (ver Ejemplo 5.2). Estos incluyen un péptido que tiene 8 aminoácidos de longitud; RGYVYQGL (SEC. N° ID 24) ha sido caracterizado como el epítipo en la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV). Similarmente, el péptido 8-mero de OVA SIINFEKL (SEC. N° ID 23, residuos 5-12) ha sido identificado como el péptido en ovoalbúmina que es presentado por la K^b/δ2, y el péptido de 9 aminoácidos de longitud ASNENMETM (SEC. N° ID 25) ha sido caracterizado como el epítipo de la proteína nuclear del virus de la gripe presentado por la D^b/δ2. La adición de estos péptidos “progenitores” a células de *Drosophila* cultivadas en Excell y expresando la Clase I de ratón resultó en la termoestabilidad a 37°C de la K^b/δ2 por el péptido de OVA y de la D^b/δ2 por el péptido de NP.

Con objeto de cuantificar la cantidad de termoestabilidad conferida por péptidos de diferente longitud y por diferentes microglobulinas β2, se examinó la estabilidad de estas diversas moléculas en lisados de células. Los lisados radiactivos de células se prepararon a partir de células de *Drosophila* que expresaban K^b/β2, L^d/β2, y D^b/β2, bien con microglobulinas β2 de ratón o humana, tal como se ha descrito previamente. Los lisados se alicuotaron a continuación y se hicieron adiciones según se describe en el Ejemplo 1.D. Para cada tratamiento, se prepararon cinco tubos; estos se incubaron a continuación a diferentes temperaturas entre 4°C y 47°C durante una hora, transcurrida la cual se inmunoprecipitó la Clase I y se analizó mediante SDS-PAGE. A continuación, se escanearon los autoradiogramas usando un densitómetro de láser, y la cantidad de señal se representó frente a la temperatura de la incubación a la que se había sometido la muestra. Se calculó la temperatura a la que el 50% de las moléculas eran estables a partir del gráfico, y se usó como una medición de las termoestabilidades relativas de las diferentes especies. Tal como se había observado previamente, las cadenas pesadas de ratón complejadas con microglobulina β2 humana fueron estables a temperaturas aproximadamente 6-8 grados superiores que si se complejaban con β2 de ratón. Interessantemente, las estabilidades impartidas por el péptido y la microglobulina β2 xenogénica eran aditivas. Un gran incremento en la termoestabilidad de las moléculas de la Clase I tiene lugar si se usan 8-9-meros en comparación con 12-25-meros; más aún, la diferencia entre la estabilización impartida por los 8-9-meros comparada con los péptidos mayores puede ser incluso mayor que la observada previamente, porque, aunque los péptidos se han purificado mediante HPLC, es probable que haya cierta contaminación de los péptidos mayores con 8-9-meros.

La tabla siguiente muestra la temperatura (en °C) a la que el 50% de las cadenas pesadas del MCH de la Clase I (se indican) son estables en los lisados de TX100, cuando se co-expresan con β2 de ratón o humana en presencia o ausencia de péptidos.

TABLA 1

MCH Clase I	Péptido	β2 de ratón	β2 humana
H2-K ^b	--	24	32
	OVA 8	45	47
	OVA 9	46	48
	VSV 8	26	34
H2-D ^b	--	27	34
	INF NP9	42	44
H2-L ^d	--	23	29

Con objeto de prestar atención a la cuestión de si el péptido puede unir moléculas de la Clase I vacías en ausencia de microglobulina β2, se prepararon lisados con detergente a partir de células de *Drosophila* que expresaban cadenas pesadas K^b o D^b de la Clase I, marcadas con ³⁵S-metionina durante una hora, y tratadas. La molécula de K^b se inmunoprecipitó con el anticuerpo Y3 y la D^b con el anticuerpo B22.249. Sólo pudieron detectarse niveles bajos de cadena pesada K^b inmunoreactiva en los lisados sin tratar. La adición de cualquier péptido que se una a la Clase I o la microglobulina β2 humana resulta en un incremento en la cantidad de material inmunoreactivo; la adición de ambos resultó en una mucha mayor cantidad de cadena pesada inmunoreactiva. Se obtuvieron resultados similares para D^b. Por tanto, parece que la cadena pesada puede unir péptido en ausencia de la microglobulina β2, no obstante, o esta unión no resulta en una conformación muy estable, o los anticuerpos usados no se unen bien a esta conformación. La adición de microglobulina β2 también conduce a un incremento en el número de moléculas inmunoreactivas, presumiblemente por la misma razón. Los efectos de estos dos reactivos son aditivos, sugiriendo que el complejo triple es la forma más estable de la molécula y/o que esta molécula es la mejor reconocida por el anticuerpo.

Estos resultados generan la pregunta de si uno puede “reconstruir” complejos de cadena pesada/β2 a partir de los lisados después del tratamiento a 30°C de temperatura. Se trataron lisados procedentes de células de *Drosophila* que expresaban K^b/β2 durante una hora a 30°C, transcurridos los cuales se añadió péptido de NP o microglobulina β2 humana. Después de su incubación a 4°C durante 4 horas, se inmunoprecipitaron las cadenas pesadas de la Clase I o con Y3 o con el anticuerpo K193 anti-cola citoplasmática. La preparación de los antisueros se describe en el Ejemplo 2.1.

Tal como se ha informado previamente, se encontró que la temperatura de tratamiento de moléculas de la Clase I vacías en lisados de Triton TX-100 no resultaba en su degradación (la molécula K^b puede inmunoprecipitarse igualmente bien después del tratamiento a 30°C con un anticuerpo anti-cola citoplasmática), pero que resultaba en su desnaturalización. Más aún, la conformación asumida por estas moléculas desnaturalizadas mediante calor es tal que ya no se unen a la microglobulina $\beta 2$, o pueden recuperarse en moléculas que son reconocidas por el Y3 mediante la adición de péptido o microglobulina $\beta 2$ humana. Por tanto, es razonable concluir que las cadenas pesadas de la Clase I pueden unir péptido, bien solas o cuando están complejadas con microglobulina $\beta 2$.

No obstante, la expresión en superficie del MHC de la Clase I humana cargado con péptido parece ser, como mucho, facilitada cargando las moléculas con péptido después de que las cadenas pesadas se hayan complejoado la microglobulina $\beta 2$.

2. Expresión del MHC humano

Una vez que se ha determinado que la termoestabilidad de una molécula de la Clase I depende del origen de la microglobulina $\beta 2$, la presencia de péptido, y la longitud y secuencia de este péptido, hemos utilizado esta información en la creación de líneas celulares capaces de activar células CD8 específicamente a través de la expresión de moléculas del MHC de la Clase I cargadas con péptido.

La termolabilidad parece ser una propiedad inherente de las moléculas de la Clase I; presumiblemente evolucionó para asegurar que las moléculas de la Clase I que, o no contienen péptido o contienen un péptido con propiedades de unión pobres (que confiere poca termoestabilidad), se autodestruyen. De esta forma, la célula minimiza el número de moléculas vacías de la Clase I sobre su superficie, puesto que tal situación sería presumiblemente peligrosa en que péptidos derivados exógenamente pueden unirse y presentarse. Las moléculas de la Clase I humana (B27 y A2.1) expresadas en células de insectos con la $\beta 2$ humana no son estables frente a una incubación extensa a 37°C; ni lo son las moléculas de la Clase I humana expresadas en la línea celular mutante T2, la cual se ha observado que es deficiente para cargar péptidos sobre moléculas de la Clase I (Hosken y Bevan, *Science* 248:367-370 (1990); Cerundolo *et al.*, *Nature* 345:449-452 (1990)). Por tanto, parece que la afinidad entre la cadena pesada y la microglobulina $\beta 2$ ha sido cuidadosamente conservada a través de la co-evolución de las moléculas, de tal forma que moléculas de la Clase I vacías, o aquéllas portando péptidos pobremente unidores, se autodestruyen a la temperatura corporal del organismo "huésped".

Se expresaron moléculas del MHC de la Clase I humana en células Schneider. Se establecieron líneas celulares que co-expresaban la microglobulina $\beta 2$ humana y el HLA A2.2Y, HLA A2.1, HLA B7 o HLA B27 usando procedimientos previamente descritos. En resumen, los cADN que codificaban las proteínas anteriores se clonaron en el vector pRmHa-3 de expresión en *Drosophila*, y se cotransfectaron con un plásmido que contenía la microglobulina $\beta 2$ humana y el plásmido phshsneo en células Schneider a través de procedimientos descubiertos en la presente invención. Tres o cuatro semanas más tarde, la población de células resistentes al G418 se diluyeron 1:5 con medio de selección nuevo. Una vez se hubo obtenido una población de células creciendo sanas, se añadió CuSO₄ a una alícuota de células y, 24 horas más tarde, se analizaron las células mediante citometría de flujo usando un anticuerpo monoclonal W6/32 (ATCC HB95, Bethesda, MD), el cual reconoce un determinante monomórfico de las cadenas pesadas de la Clase I humana cuando están asociadas con la microglobulina $\beta 2$. (Ver Barnstable *et al.*, *Cell* 14:9 (1978)). Se indujeron niveles elevados de expresión en superficie de cada una de las moléculas de la Clase I humana inducidas por la adición de CuSO₄ (no se muestran los datos). Estas poblaciones estables se clasificaron en busca de células de elevada expresión usando citofluorimetría tal como se describe más abajo. Son estas estas poblaciones de células clasificadas las que se usaron para todos los experimentos subsiguientes.

Veinticuatro horas antes del análisis con FACS, se añadió CuSO₄ a las células Schneider establemente transfectadas (3-4 × 10⁶ células/ml) hasta una concentración final de 1 mM, "encendiendo", por tanto la expresión a partir de los genes transfectados. Se sembraron las células en placas de 24 pocillos (2 ml por pocillo). Ocho horas antes del análisis FACS, se reemplazó el medio CuSO₄ con medio nuevo (1 ml), con o sin péptido a una concentración de 50 µg/ml. Se realizaron desafíos de temperatura a 37°C transfiriendo las placas a una superficie plana en una habitación a 37°C, a diversos intervalos de tiempo, antes de recolectar las células para su análisis.

Para analizar la expresión en superficie del MHC de la Clase I sobre las células Schneider, se transfirieron alícuotas de células (5 × 10⁵) a tubos en hielo, se recolectaron mediante centrifugación (1000 × g, durante 4 minutos), se resuspendieron en 3 ml de PBS/BSA al 1%, 0,02% azida sódica, se recolectaron mediante centrifugación, y se resuspendieron en PBS/BSA (0,5 ml) conteniendo el anticuerpo primario apropiado (fluidos ascíticos Y3, 28:18:8S, 30.5.7, W6/32, diluidos 1:200). Los antiseros de conejo se diluyeron 1:500 y el sobrenadante de hibridomas B22.293 se usó directamente. Después de una hora de incubación sobre hielo, se lavaron las células dos veces en 3 ml de PBS/BSA y se resuspendieron en 0,5 ml de PBS/BSA que contenía el anticuerpo secundario marcado con FITC (Cappell, Durham, NC) y 1 mg/ml de yoduro de propidio. Después de 30 minutos de incubación sobre hielo, se lavaron las células una vez con PBS/BSA y se resuspendieron en este tampón a una concentración de 1 × 10⁶/ml. A continuación se analizaron las muestras mediante FACS 440 (Becton Dickinson). Las células muertas teñidas con yoduro de propidio, se excluyen mediante la inclusión de una compuerta viva en el análisis.

Para la clasificación de las células se usó el mismo procedimiento descrito más arriba, excepto que todas las operaciones de tinción se realizaron en una campana estéril. Las soluciones, incluyendo los anticuerpos, se esterili-

zaron mediante filtración, y se usó medio de Schneider o Excell 400 en lugar del PBS/BSA. Las células que unían específicamente el anticuerpo primario se clasificaron usando un clasificador de células Becton Dickinson. Las células clasificadas ($2-8 \times 10^5$) se lavaron una vez en medio antes de sembrarlas a una concentración de 2×10^5 células/ml.

Con objeto de demostrar que las moléculas de la Clase I humana expresadas sobre la superficie de células de *Drosophila* están vacías, se incubaron las células a 37°C durante dos horas, y se analizó la expresión sobre la superficie celular mediante citofluorimetría. La expresión sobre la superficie de ambos HLA, B27 y A2.1, está enormemente reducida si las células se incuban a 37°C durante 2 horas; no obstante, preincubando las células en péptidos HIV, que se sabe se unen a las moléculas de la Clase I, permite una estabilidad térmica significativa de la Clase I, mientras que los péptidos que no se unen no tienen poco efecto (ver Figura 5A). Un péptido de 9 aminoácidos (ILKEPVHGV, SEC. N° ID 31) procedente de la proteína POL del VIH se une y estabiliza el HLA A2.1. Un péptido de 9 aminoácidos procedente de la proteína Vpr del VIH se une y estabiliza el B27 (FRIGCRHSR, SEC. N° ID 30). Estos datos muestran que las moléculas de la Clase I humana expresadas sobre la superficie de células de *Drosophila* están vacías y pueden estabilizarse mediante la unión de péptidos del VIH específicos.

La Figura 5A muestra la termoestabilización inducida por péptido del HLA B27 y HLA A2.1 expresados sobre la superficie de células de *Drosophila* mediante péptidos del VIH. Se incubaron células de *Drosophila* que expresaban HLA B27 o A2.1 con péptidos donde se indica, y se mantuvieron a continuación a 28°C o se incubaron a 37°C durante dos horas antes del análisis de la expresión sobre superficie de las moléculas de la Clase I mediante el uso del anticuerpo W6/32 (procedente de ATCC HB95) y citofluorimetría. La fluorescencia promedio de cada población celular se muestra representada frente a las condiciones de incubación. El péptido de POL del VIH (ILKEPVHGV, SEC. N° ID 31) estabiliza el A2.1 pero no el B27, mientras que el péptido de Vpr (FRIGCRHSR, SEC. N° ID 30) estabiliza el B27 pero no el A2.1.

La Figura 5B ilustra que el HLA A2.2Y expresado en células de *Drosophila* tiene características de las moléculas de la Clase I vacías en lisados con Triton X100. Los lisados radiactivos con Triton X100, preparados a partir de células de *Drosophila* que expresaban el A2.2Y, se alicuotaron y las adiciones de péptidos se hicieron tal como sigue: A y B: sin adiciones; C: un péptido KRWILGLN (SEC. N° ID 29) de GAG (B) de VIH; D: péptido de la gripe ILGFVTLTV (SEC. N° ID 32); E: péptido 8-mero aleatorio; F: péptido 9-mero aleatorio. Las alícuotas B-F se incubaron a 37°C durante una hora antes de su inmunoprecipitación con W6/32 y análisis mediante SDS-PAGE.

La Figura 5C muestra que el HLA B7 expresado en células de *Drosophila* tiene características de moléculas de la Clase I vacías en lisados de Triton X100. Los lisados se prepararon como en la Figura 5B, en células de *Drosophila* que expresaban el HLA B7. Las alícuotas o no recibieron péptido (-P) o péptido aleatorio de 18-meros o 9-meros según se indica. La mitad de las alícuotas se incubaron a 39°C durante una hora antes de su inmunoprecipitación con W6/32 y SDS-PAGE.

También se observó que el HLA B7 y A2.2Y expresados en células de *Drosophila* estaban vacíos, ya que se encontró que eran termolábiles en lisados de células con Triton TX100 (ver Figuras 5B y 5C); no obstante, pudieron estabilizarse mediante la adición de péptidos a los lisados antes del desafío de temperatura. En particular, puede verse que un 10-mero derivado de la matriz de la gripe, ILGFVTLTV (SEC. N° ID 32) (Gotch *et al.*, *J. Exp. Med.* 168:2045-2057 (1988)) estabiliza el HLA A2.2, así como lo hace un péptido 8-mero aleatorio que también estabiliza el HLA B7.

El desafío de temperatura para los lisados de células con Triton TX100 se realizó como se ha descrito previamente en la presente invención para la Clase I de ratón. La conclusión a partir de estos estudios es que las moléculas de Clase I humanas expresadas en células de *Drosophila* tienen todas las características de las moléculas vacías expresadas en la línea celular mutante T2 (Salter *et al.*, (1985), ver más arriba; Hosken y Bevan (1990), ver más arriba).

Ejemplo 2

Generación de péptidos con características de unión óptimas para moléculas de la Clase I

A. Discusión y visión de conjunto

Datos recientes han demostrado que las moléculas de la Clase I unen péptido, los cuales contiene motivos secuencia consenso. (Ver Falk *et al.*, *Nature* 351:290-296 (1991); Van Bleek y Nathenson, *Nature* 348:213-216 (1990)). Por tanto, los residuos amino- y carboxi-terminales de péptidos unidos a una determinada forma alélica de la molécula de la Clase I parecen estar restringidos a unos pocos tipos de aminoácidos, y uno o más residuos internos tendrían que ocupar posiciones específicas. Falk *et al.*, ver más arriba (1991); Van Bleek *et al.*, ver más arriba (1990). El examen de la unión de péptidos a la molécula K^b de ratón confirma que un péptido de ovoalbúmina, OVA-8, con la secuencia SIINFELK (SEC. N° ID 23, residuos 5-12), el cual se une a las moléculas de K^b *in vivo*, contiene un motivo de unión óptimo y se une intensamente a las moléculas de K^b *in vitro*. Puesto que esta secuencia peptídica está flanqueada en la molécula de ovoalbúmina por las secuencias ...QLE y TEW..., es evidente que varias proteasas, una proteasa con una especificidad de sustrato muy amplia, o un complejo enzimático con múltiples actividades proteolíticas, deben ser responsables de la generación del péptido OVA-8 a partir de la ovoalbúmina intacta.

Para examinar si los proteosomas aislados pueden generar el péptido óptimo para la unión a moléculas de K^b , fue útil hacer uso del hallazgo de que moléculas de K^b de la Clase I vacías, es decir, aquéllas sin péptido unido- son muy termolábiles (Ljunggren *et al.*, ver más arriba (1990)). La incubación de moléculas K^b vacías en detergente a 30°C durante una hora hace que el anticuerpo Y3, específico para K^b y dependiente de $\beta 2M$, sea incapaz de reaccionar con la molécula de K^b porque la $\beta 2M$ se disocia rápidamente de la cadena pesada. La unión de un péptido apropiado tal como la OVA-8 impide la disociación de la subunidad, permitiendo que el Y3 se una al complejo de la Clase I. Péptidos de la misma longitud que OVA-8, los cuales no pueden ser presentados por moléculas de K^b *in vivo* (por ejemplo, el péptido SNENMETM (SerAsnGluAsnMetGlyThrMe) (SEC. N° ID 25, residuos 2-9), el cual se une a D^b , Townsend *et al.*, *Cell* 44:959-968 (1986)) son incapaces de prevenir la disociación inducida por calor de las moléculas la Clase I K^b (ver Figura 3). El péptido OVA-24 con la secuencia EQLESIINFEKLTEWTSSNVMEER (SEC. N° ID 23) (el cual abarca la secuencia de OVA-8, se muestra subrayada) se une débilmente a las moléculas de K^d . No obstante, la débil unión del OVA-24 no fue suficiente para impedir que el complejo K^b - $\beta 2M$ se disociara a 30°C.

Los diversos antisueros se prepararon como sigue. El antisuero K193 se genera inmunizando conejos con la limfocianina de la lapa con forma de ojo de cerradura (*Keyhole Limpet*) (Calbiochem, La Jolla, CA) conjugada con péptido sintético correspondiente a la secuencia COOH terminal de la H-2K^b (LPDCKVMVHDP SLA o LeuProAspCysArg-ValMetValHisAspProSerLeuAla) (SEC. N° ID 33). Los ascites Y3 se prepararon usando el hibridoma HB176 (ATCC, Rockville, MD). (Ver también Hammerling *et al.*, *PNAS USA* 79: 4737-4741 (1982). Los ascites 28-14-8S se prepararon a partir del hibridoma HB 27 (ATCC, Rockville, MD). (Ver Ozato y Sachs, *J. Immunol.* 126:317-321 (1980); Myers *et al.*, *J. Immunol.* 142:2751-2758 (1989)). Los ascites 30-5-7 se prepararon a partir del sobrenadante de cultivo procedente del hibridoma B22.249 (Ver Hammerling *et al.*, *Immunogenetics* 8:433-445 (1979); Allen *et al.*, *Nature* 309:279-281 (1984)). Los antisueros policlonales purificados contra el MHC de ratón se prepararon de acuerdo con Kvist *et al.*, *Scan. J. Immunol.* 7:265-276 (1978). Los anticuerpos secundarios marcados con FITC (IgG de cabra anti-ratón y anti-conejo purificadas mediante afinidad) se obtuvieron a partir de Cappell (Durham, NC).

Usando este sistema de ensayo, se incubaron moléculas con el anticuerpo monoclonal Y3, específico para K^b , K^b "vacías" marcadas biosintéticamente procedentes de células RMA-S, las cuales no consiguen cargar péptidos sobre las moléculas de la Clase I, se incubaron con el anticuerpo monoclonal Y3 específico para K^b , y dependiente de $\beta 2M$. Las moléculas unidas a anticuerpo se separaron mediante SDS-PAGE y se visualizaron mediante autoradiografía. El análisis de SDS-PAGE se realizó como sigue. Los inmunoprecipitados recolectados para cuentas de proteóna A-Sepharose se lavaron cinco veces con 1 ml de TX100 al 0,1%/PBS, e inmediatamente se hirvieron en tampón de muestras del SDS-PAGE o, donde se indica, después de la digerir la mitad de la muestra con Endoglicosidasa H (ver Jackson *et al.*, *EMBO J.* 9:3153-3162 (1990)). A continuación se analizaron las muestras sobre geles de SDS-PAGE con un gradiente del 10-15%, y se trataron con Amplify (Amersham, Arlington Heights, IL) antes de autoradiografiarlas a -70°C usando película Kodak XOMat (Rochester, NY).

Las bandas correspondientes a la cadena K^d se cuantificaron mediante densitometría. Para generar los datos (no se muestra) se incubaron lisados de células RMA-S, que contenían moléculas K^b de la Clase I "vacías", con péptido y/o proteosomas purificados antes de su incubación a 4°C o 30°C. durante una hora. Las moléculas de K^b se inmunoprecipitaron con el anticuerpo monoclonal Y3, y se analizaron mediante SDS-PAGE. Las moléculas K^b "vacías" se incubaron con OVA-24; proteosomas solos; OVA-24 y proteosomas; OVA-24, proteosomas, y p-hidroximercuribenzoato; y OVA-8. Se analizaron los lisados que contenían K^b "vacía" sola (no se muestran los datos). Antes de la inmunoprecipitación, se desafiaron las moléculas con calor a 30°C durante una hora, y se mantuvieron a 4°C durante el mismo período (no se muestran los datos). El péptido OVA-8 se usó a una concentración final de 75 μM y el péptido OVA-24 a una concentración de 75 μM .

Las moléculas de K^b incubadas durante la noche a 4°C se disociaron casi completamente, a juzgar por su ausencia de reactividad con el anticuerpo, pero se recuperaron cuantitativamente de la mezcla de incubación que contenía el péptido OVA-8.

Los barridos densitométricos de los carriles numerados pares (no se muestran los datos) permitieron la determinación de la cantidad de K^b recuperada después del desafío con calor. Los datos se expresaron como porcentajes de la cantidad de complejos K^b /OVA-8 recuperados después del desafío con calor. La mayoría de las moléculas de K^b , las cuales se habían incubado con OVA-8, permanecieron intactas después del tratamiento a 30°C. El péptido más largo, OVA-24, no fue tan eficiente como el OVA-8 para estabilizar las moléculas de K^b , y, en concordancia con nuestros datos previos sobre la unión débil del OVA-24, sólo aproximadamente el 30% de las moléculas permanecieron después del tratamiento con calor. Cuando la mezcla de incubación contenía el péptido OVA-24 y proteosomas purificados, pudieron precipitarse un mayor número de moléculas de K^b , y aproximadamente el 80% de las moléculas de K^b sobrevivieron a la exposición a 30°C. Que la estabilidad incrementada de las moléculas de K^b se debía a péptido(s) derivado(s) del OVA-24 era evidente a partir del hecho de que los proteosomas solos fallaron para generar péptidos en el lisado que pudieran prevenir la disociación del complejo K^b - $\beta 2M$. Esta conclusión está apoyada también por el hecho de que los proteosomas tratados con el inhibidor p-hidroximercuribenzoato (Rivett, *Arch. Bioch. Biophys.* 268:1-8 (1989)) no consiguieron generar péptidos procedentes de OVA-24, lo cual puede estabilizar las moléculas de K^b a 30°C.

Estos datos demostraron que los proteosomas aislados pueden generar péptido(s) a partir de un péptido precursor que se une débilmente a K^b , de tal forma que la molécula de la Clase I fue estabilizada hasta el mismo nivel que con péptidos endógenos. En consecuencia, el(los) péptido(s) derivados del OVA-24 deberían tener aproximadamente

8 aminoácidos de longitud y deben haber abarcado la secuencia del péptido OVA-8. Además, experimentos similares en los que se incubó ovoalbúmina desnaturalizada, reducida, y alquilada, con proteosomas, también resultaron en la recuperación de moléculas K^b termoestables (no se muestran los datos).

5 B. Procedimientos

1. Cultivos celulares

Se cultivaron células HeLa (ATCC n° CCL 185) en medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM, Gibco, Grnad Island, NY) suplementado con un 8% de suero fetal bovino, glutamina 2 mM, penicilina (100 µg/ml), y estreptomicina (100 µg/ml). Los esplenocitos de cuatro haplotipos de H-2 diferentes (H-2^k, ^s, ^d, y ^q), RMA-S, T1, T2 y astrocitos de ratón se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY). RMA-S, un mutante de ratón de la línea celular H-2^b de linfoma (Ljunggren y Karre, *J. Exp. Med.* 162:1745-1759 (1985); Karre *et al.*, *Nature* 319:675-678 (1986)), es incapaz de presentar antígenos endógenos (Twonsend *et al.*, *Nature* 340:443-448 (1989); Townsend y Bodmer, *Ann. Rev. Immunol.* 7:601-624 (1989)). T1 y T2 derivan de la línea celular mutante LBL 721.174 (0.174) de linfoblastoides B fusionados al linfoma CEM de células T (Salter *et al.*, *Immunogenetics* 21:235-237 (1985)). T1, del híbrido 0.174-CEM, expresó niveles elevados del MHC de la Clase I derivado del 0.174. T2, seleccionada por la pérdida de ambas copias del cromosoma 6 humano, tiene el fenotipo de expresión inferior de la Clase I del 0.174 (Hosken y Bevan, *Science* 248:367-370 (1990)).

2. Radiomarcaje metabólico, inmunoprecipitación, y densitometría

El marcado metabólico de células se llevó a cabo como se describe en Jackson *et al.*, *EMBO J.* 9:3153-3162 (1990), con las siguientes modificaciones. A menos que se indique lo contrario, las células se trataron con interferón gamma (IFN-gamma; Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) (2500 U/ml) durante 96 horas antes del marcado metabólico. El medio del pulso contenía 0,15 mCi/ml de L[35S]metionina-deficiente y cisteína-deficiente DMEM. Las células se marcaron rutinariamente durante 4 horas seguidas por períodos de caza de diferentes intervalos de tiempo (hasta 36 horas) en presencia de medio de cultivo normal. La inmunoprecipitación, la SDS-PAGE (Blobel y Dobberstein, *J. Cell. Biol.* 67:835-851 (1975)) y la fluorografía (Bonner y Laskey, *Eur. J. Biochem.* 46:83-88 (1974)) se realizaron tal como se ha descrito (Jackson *et al.*, *EMBO J.* 9:3153-3162 (1990)). La electroforesis en gel con gradiente de pH no en equilibrio en la primera dimensión (usando anfólinas de pH 3,5-10) se realizó como se describe en Jones, en *Selected Methods in Cellular Immunology*, Eds. Mishell y Shigii, Freeman, San Francisco, 1980, pp. 398-400. Para cuantificar la radiactividad incorporada en la proteína, se determinaron las intensidades de las bandas en las fluorografías mediante densitometría de barrido usando un Ultrosanal XL de LKB (Brouma, Suecia). Las proteínas marcadoras radiactivas, albúmina de suero bovina (67 kDa), ovoalbúmina (46 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa) y lactoglobulina A (18,4 kDa) se compraron a New England Nuclear (duPont, Boston, MA).

Para el análisis del pulso-caza, los lisados procedentes de varios instantes se alicuotaron en tubos dependiendo del número de antibióticos que se usaban para analizar el transporte. Se añadió anticuerpo al lisado (1 µl de fluido de ascites, Y3, 30.5.7, 28:14:8S, W6/32), o antisuero (K193, K270), 100 µl de sobrenadante de cultivo de hibridomas (anticuerpo B22.293); la mezcla se dejó durante 2-12 horas antes de recoger el anticuerpo mediante incubación con proteína A Sepharose durante una hora, y 5 segundos de centrifugación en la microfuga.

3. Antisueros, anticuerpo monoclonal y péptidos

Los sueros de conejo anti-humano y anti-proteosomas de rata fueron proporcionados amablemente por el Dr. A. Ichihara (Tanaka *et al.*, *J. Cell Physiol.* 139:34-41 (1986)). Los ascites Y3, un anticuerpo monoclonal contra la H2-K^b de ratón, se prepararon usando el hibridoma n° HB 176 de las ATCC (Hammerling *et al.*, *PNAS USA* 79:4737-4741 (1982)). El IFN-gamma procedente de linfocitos T humanos se obtuvo de Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). El IFN-gamma de ratón se obtuvo de Genentech (South San Francisco, CA) y de Amgen Biologicals (Thousand Oaks, CA). Los péptidos se sintetizaron mediante técnicas de fase sólida en un sintetizador de péptidos 430A de Applied Biosystems, y se purificaron adicionalmente en una columna de cromatografía en fase inversa C₁₈ (VyDac).

4. Fraccionamiento con sulfato amónico de homogenados de células HeLa

Las células HeLa homogeneizadas, no tratadas o tratadas con IFN-gamma, se centrifugaron para suprimir los restos nucleares y celulares, y los sobrenadantes resultantes se sometieron a fraccionamiento con sulfato amónico según se describió (Rivett, *J. Biol. Chem.* 260:12600-12612 (1985)). Los complejos de proteosoma de 26S presentes en el sobrenadante se precipitaron selectivamente a una saturación del 38%, mientras que los complejos de proteosomas de 19S presentes en el sobrenadante después del paso de fraccionamiento al 38% se precipitaron con sulfato amónico al 60% (Wazman *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262:2451-2457 (1987)).

5. Fraccionamiento de microsomas y citosol

Las células HeLa no tratadas y tratadas con IFN-gamma se marcaron durante 4 horas, se homogeneizaron, y se sometieron a centrifugación diferencial. Los homogenados se centrifugaron primero a 15.000 r.p.m. durante 30 minutos para suprimir los restos nucleares y celulares. Los sobrenadantes resultantes se centrifugaron a continuación a 100.000 × g durante 30 minutos para precipitar los microsomas. Los proteosomas en las fracciones sobrenadantes

(fracción citosólica) y en los precipitados (fracción microsomal cruda) se inmunoprecipitaron separadamente y se analizaron mediante electroforesis en gel bidimensional.

6. Purificación de proteosomas

Los proteosomas se purificaron a partir de hígado bovino reciente usando una modificación del procedimiento descrito por Skilton *et al.* (1991). En resumen, se homogeneizó el hígado bovino reciente en Tris-HCl 10 mM (pH 7,2), KCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM, y glicerol al 20% (v/v) ("tampón A"). El homogenizado se centrifugó a $105.000 \times g$ durante una hora. El sobrenadante se trató primero con sulfato amónico al 38% de saturación con objeto de suprimir los grandes agregados proteicos así como la forma 26S del proteosoma (Waxman *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262:2451-2457 (1987)). El sobrenadante restante se trató a continuación con sulfato amónico al 60% de saturación con objeto de precipitar selectivamente la forma 19S del proteosoma. Se resuspendió el precipitado en un pequeño volumen de tampón A. La fracción de 60% de sulfato amónico resuspendida se sometió a tres pasos de cromatografía secuencial: DEAE-Sepharose, cromatografía de intercambio iónico con Mono Q 10/10, y finalmente gel filtración en una columna de Superose 6. Después de cada paso de cromatografía, las fracciones que contenían proteosomas se identificaron mediante SDS-PAGE, y mediante análisis de la actividad peptidasa tal como se describe en Hough *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262:8303-8313 (1987). Los sustratos de péptidos usados fueron: N-succinil-ala-ala-phe-MCA, N-succinil-leu-leu-val-tyr-phe-MCA, y t-butoxicarbonil-phe-ser-arg-MCA.

7. Ensayo de unión del péptido

El lisado de células RMA-S que conteniendo molécula K^b de la Clase I vacía ser preparó usando un procedimiento modificado (Ljunggren *et al.*, *Nature* 346:476-480 (1990)). En resumen, las células RMA-S se cultivaron en RPMI 1640 a 26°C durante 8 horas. A continuación se lavaron las células una vez en PBS y se incubaron de nuevo a 26°C en medio que contenía 0,25 mCi/ml de L-[³⁵S]metionina y, 25 mCi/ml de L-[³⁵S]cisteína en RPMI 1640 carente de metionina y carente de cisteína, y en medio RPMI 1640 normal, en una proporción de 10:1, durante 16 horas. Se aclararon las células en PBS y se lisaron tal como se describe más arriba. A continuación se incubó el lisado conteniendo moléculas K^b de la Clase I vacías con péptidos y/o proteosomas purificados, a 26°C, durante 1 hora, antes de someterlo a incubación a 30°C durante una hora adicional. A continuación se sometió esta mezcla a inmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal Y3, y se analizó mediante SDS-PAGE.

Ejemplo 3

Inducción de efectores citotóxicos *in vitro*

A. Carga osmótica

La carga osmótica de células SC2 y 3T3 con proteína ovoalbúmina se realizó tal como describen Moore *et al.*, *Cell* 54:777-785 (1988). El procedimiento de ensayo es como sigue. En una placa de pocillos, se co-cultivaron 1×10^5 células de *Drosophila* (con o sin carga de proteína/péptido) o células 3T3 con 1×10^5 células del hibridoma B3/CD8T, en 200 μ l de medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%. Después de 24 horas de incubación, se añadieron 100 μ l del sobrena procedente de estos cultivos a 100 μ l de RPMI que contenía 5000 células CTLL. Se co-cultivaron las células durante 24 horas a 37°C cuando se añadieron 1 μ Ci de ³H-timidina (Amersham). Después de una incubación adicional de 15 horas a 37°C, la incorporación de radiomarcage en las células CTLL se determinó mediante recuento del centelleo.

Los ensayos realizados con MHC de ratón también verificaron que las células de insecto son capaces de cargar péptido sobre las moléculas de la Clase I. Células expresando tan pocas como 200-500 moléculas del MHC conteniendo un antígeno determinado pueden ser detectadas por una célula T. Puesto que las células de *Drosophila* no acumulan cromo, se usó un ensayo de presentación de antígeno basado en B3/CD8, un hibridoma de célula T. B3/CD8 es un hibridoma entre B3, una célula T citotóxica específica para el péptido de la ovoalbúmina 253-276 presentado por moléculas H-2K^b de la Clase I, y la línea celular portadora de CD8 y secretora de IL-2 (ver Carbone *et al.*, ver más arriba, 1989). A partir de la estimulación antigénica, la B3/CD8 produce IL-2, mediada mediante incorporación de ³H-timidina en la línea celular CTLL dependiente de IL-2 (Gillis *et al.*, *Immunol.* 120:2027-2029 (1978)). Por tanto, midiendo la cantidad de IL-2 producida, se puede ensayar el reconocimiento de células T.

Con objeto de proporcionar un conjunto intracelular de proteína ovoalbúmina a partir de la cual pudieran derivarse péptidos, la ovoalbúmina (Sigma Chem. Co., MO) se cargó osmóticamente en las células tal como describieron Moore *et al.*, ver más arriba (1988). Inmediatamente después de cargarlas, se mezclaron las células con el hibridoma de la célula T. Después de dos días de incubación, se retiró el medio y se ensayó en busca de IL-2. La cantidad de IL-2 se determinó por la capacidad del medio de mantener el crecimiento de la línea celular CTLL dependiente de IL-2 (Gillis *et al.*, ver más arriba (1978)), y el crecimiento se cuantificó mediante la cantidad de timidina radiactiva incorporada en las células. Puede observarse en la Figura 4 que las células T respondieron a las células de *Drosophila* si se añadía al medio el péptido de ovoalbúmina. Las moléculas del MHC de la Clase I expresadas sobre la superficie celular de la célula de insecto son completamente funcionales en que pueden unir péptido si se añade al medio de cultivo, y pueden presentarlo en el contexto correcto para que sea reconocido por una célula T.

B. Optimización de condiciones *in vitro*

Para la optimización de las condiciones *in vitro* para la generación de células T citotóxicas específicas, el cultivo de células estimulantes de células de *Drosophila* se mantiene preferiblemente en medio libre de suero (por ejemplo, Excell 400). Las células estimulantes de células de *Drosophila* se incuban preferiblemente con $> 20 \mu\text{g/ml}$ de péptido. La proporción efectoras:estimulantes (proporción celular de linfocito:*Drosophila*) está preferiblemente en el rango de aproximadamente 30:1 hasta 300:1. El máximo específico de CD8 se observa generalmente después de cinco días de cultivo. El cultivo de células diana para ensayos de destrucción (*killing assay*) se mantiene preferiblemente en un medio carente de suero.

C. Ensayo citotóxico de liberación de ^{51}Cr

La actividad citolítica mediada por células se detectó con ^{51}Cr o ensayo de liberación. El porcentaje de lisis específica de 10^4 células diana marcadas con ^{51}Cr en $200 \mu\text{l}$ se determinó para varias proporciones de linfocito respecto células diana, y varias curvas de dosis-respuestas de cada población mediante la representación de las citotoxicidad específica frente al $\log_{10}$ del número de efectoras viables. Los valores de liberación espontánea de ^{51}Cr variaron entre el 5% y el 15% del marcaje total incorporado. El porcentaje de liberación específica de ^{51}Cr se calculó de acuerdo con la fórmula siguiente: $(\text{ER}-\text{MR}) / (\text{MR}-\text{SR}) \times 100$, en donde ER es la liberación de ^{51}Cr experimental observada, SR es la liberación espontánea detectada incubando células diana en medio de cultivo solo, y MR es el máximo de radiactividad liberada a partir de células diana después de su incubación en $200 \mu\text{l}$ de HCl durante la duración del ensayo.

D. Inducción de efectores citotóxicos mediante estimulación primaria *in vitro* con células de *Drosophila* que expresan la Clase I de ratón y péptidos

Los péptidos OVA, NP (gripe) y NP (LCMV) se usaron como una fuente de péptidos para verificar su capacidad para generar una respuesta CD8 primaria *in vitro*. (Ver Figuras 6A y 6B). Una incubación de cinco días de células de bazo procedentes de ratones Balb/c inmunizados con C57BL/6, con las respectivas células de *Drosophila* expresando el antígeno H2-K^b + antígeno H2-L^d + antígeno, generó efectores que eficientemente lisaron el tumor EL4 y P815 en presencia de péptidos.

P815 (ATCC T1B 64) (H2-L^d) es un mastocitoma procedente de ratones DBA/2. EL4 (ATCC T1B 39) es un timoma procedente de C57BL/6 (H-2^b). EL4 se transfectó con cADN de OVA en una construcción de plásmido con el promotor de la β -actina humana para derivar la línea celular EL4-OVA de producción de OVA. Estos tumores se mantuvieron como cultivos en suspensión estacionarios en RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero fetal bovino FBS (ver Moore *et al.*, *Cell* 54:777-785 (1988)). Jurkat (ATCC CRL 8163) es una línea celular humana que expresa el HLA B7. Jurkat A2 es una línea celular transfectada producida transfectando células Jurkat con HLA A2.1, por ejemplo, a través de procedimientos descritos en la presente invención. (Ver también Irwin *et al.*, *J. Exp. Med.* 170:1091-1101 (1989)).

Los péptidos sintéticos pueden sustituirse por proteínas virales sintetizadas endógenamente durante el reconocimiento de CD8. La CD8 específica generada pudo reconocer péptidos sintetizados endógenamente presentados por la Clase I sobre la superficie de EL4 (transfectada con un ADN de ovoalbúmina). (Ver Moore *et al.*, *Cell* 54:777-785 (1988)). Similarmente, la CD8 generada *in vitro* contra la D^d cargada con péptido NP de la gripe reconoció células diana EL4 infectadas con la cepa A/PR/8 del virus de la gripe (ver Figura 7). (Ver Carbone *et al.*, *J. Exp. Med.* 167:1767-1779 (1988); la cepa A/PR/8/34 está también disponible a partir de la American Type Culture Collection con el número de acceso ATCC VR-95).

E. Caracterización de células citotóxicas antipéptido

Para determinar si el reconocimiento específico del péptido era debido a la actividad de la célula T, estas líneas se trataron con anti-CD8 (OKT8, ATCC n° CRL 8014) o anti-CD8 (OKT4, ATCC n° CRL 8002) y/o complemento, antes de su adición al cultivo de ensayo. Sólo el tratamiento con anti-CD8 abolió la citotoxicidad.

Estos CD8 específicos se ensayaron con células 3T3/D^b y 3T3/K^b, producidas mediante transfección de células BALB 3T3 (ATCC CCL 163) respectivamente con D^b o K^b. (Otros cultivos de 3T3 son fácilmente asequibles para su uso, incluyendo el ATCC CCL 163.2). Preferiblemente, se prepararon transfectantes estables vía cotransfección de 3T3 mediante p^{CKU}/K^b o p^{CMU}/D^b y pSV2neo, y se seleccionaron con G418 (Ver también Joly y Oldston, más arriba (1991)). La respuesta de CD8 anti-OVA estuvo restringida por D^b o K^b, confirmando que estas actividades muestran la restricción clásica del MCH de la Clase I.

La capacidad de elicitar CD8 mediante la estimulación con péptidos permite una técnica relativamente sencilla con la que estudiar el reconocimiento restringido de la Clase I. Puesto que las células T son específicas para formas desnaturalizadas en vez de naturales o antígenos ajenos, los péptidos representan claramente un medio potencial de vacunación efectiva.

F. Generación de células CD8 específicas

Los complejos de Clase I-péptido de célula de *Drosophila* se fijaron con glutaraldehído al 0,001% y se lavaron a continuación, y se usaron como estimulantes es co-cultivos de linfocitos. Transcurridos 5 días de co-cultivo se detectó una actividad citotóxica muy débil, confirmando que las células de *Drosophila* vivas (es decir, no fijadas) son superiores para generar CD8 específicos. La adición de un 10% de sobrenadante del cultivo de *Drosophila* a las células fijadas restablece la generación de CD8 específicos. (Ver Figuras 8A y B).

Las células cultivadas que expresaban los antígenos sinérgicos de la Clase I, las cuales ordinariamente no conseguían activar los CD8 en cultivos primarios, fueron capaces de generar CD8 específicos después de la adición de sobrenadante del cultivo de células de *Drosophila*.

La supresión de células CD4+ y Clase II+ de la población que responde disminuye la actividad CD8 generada con péptido cargado sobre células de *Drosophila*. Por tanto, la respuestas primarias inducidas por las células de *Drosophila* cargadas de péptido parece ser dependiente de células CD4+ de la Clase II.

Ejemplo 4

Eficacia *in vivo* del tratamiento

A. Rechazo de tumores

Usando los procedimientos descubiertos en la presente invención, es ahora posible matar específicamente células diana en humanos usando las células CD8 activadas, específicas, de la presente invención. Esencialmente, la metodología de tratamiento incluye los siguientes pasos: (1) obtener una muestra de fluido conteniendo células T procedentes de un individuo a ser tratado; (2) cargar moléculas del MHC de la Clase I vacías con al menos una especie de péptido antigénico, en donde el péptido es sustancialmente homólogo a al menos una porción de un péptido derivado de la célula diana; (3) mezclar las células T *in vitro* con una cantidad de moléculas del MHC de la Clase I cargadas con péptido suficiente para producir células CD8 activadas; (4) recolectar las células CD8 activadas del cultivo; y (5) administrar las células CD8 activadas al individuo a tratar.

Esta metodología ya está mostrando resultados prometedores en un modelo con ratón. Por ejemplo, en un estudio, se inyectaron subcutáneamente ratones hembras C57BL/6 (aproximadamente de 6-8 semanas de edad) con tres millo- nes (3MM) de células tumorales EL4/OVA justo detrás de las orejas. Las células tumorales se hicieron tumorigénicas mediante un único pasaje en ratones C57BL/6. El día de la inoculación subcutánea con células tumorales EL4/OVA, se inyectaron los ratones con células CD8 estimuladas con *Drosophila*/K^b/OVA, bien cerca de (proximales a) el sitio de inyección de las células tumorales, o intravenosamente.

El día 8, se midieron las dimensiones del tumor. Los cinco ratones control que habían recibido sólo los 3MM de células tumorales tenían tumores que medían 12 mm × 12 mm de tamaño. Se examinaron tres ratones que recibieron células tumorales y 24MM de células CD8 inyectadas IV; el tamaño de los tumores era (a) 2 mm × 2 mm, (b) 5 mm × 5 mm, y (c) 12 mm × 12 mm en esos ratones. Se examinaron cinco ratones que recibieron células tumorales y 24MM de células CD8 cerca del sitio de inyección del tumor. Los resultados fueron como sigue: (i) tres ratones no tenían tumores detectables el día 8; (ii) un ratón tenía un tumor que medía 1 mm × 1 mm; y (iii) un ratón tenía un tumor que medía 5 mm × 5 mm.

En el día, se determinó que los tamaños de los tumores eran como sigue:

	Grupo	# ratón	Tamaño del tumor
50	Control	3	15 mm × 12 mm
	"	2	20 mm × 12 mm
55	3MM tumor + 24MM CD8 IV	1	5 mm × 5 mm
	"	1	10 mm × 5 mm
	"	1	13 mm × 8 mm
60	3MM tumor + 24MM CD8 IP	2	SIN TUMOR
	"	1	0,5 mm × 1,0 mm
	"	1	1 mm × 1 mm
65	"	1	1,5 mm × 1,5 mm

En un experimento subsiguiente, se midió el volumen de tumores en ratón después de que se aplicaran varios regímenes. Los ratones se inyectaron con tres millones (3MM) de células tumorales EL4/OVA tal como se describió más arriba. El día de las inoculaciones adicionales con células tumorales EL4/OVA, los ratones se inyectaron previamente con células CD8 estimuladas con *Drosophila*/K^b/OVA de forma intraperitoneal, subcutánea o intravenosa, según se describe en la Tabla 2 más abajo. El volumen del tumor se midió en los días 6, 8, 10, 12 y 20, a continuación de la inyección. En cada experimento y en el grupo de control se incluyeron cinco ratones. Los resultados se detallan en la Tabla 2 más abajo.

TABLA 2

Ratón	#CD8/Procedimiento	VOLUMEN MEDIDO DEL TUMOR, DÍA				
		6	8	10	12	20
15	1 30MM, IP	0	0	0	0	0
	2 "	0	0	0	0	0
	3 "	0	0	0	0	0
	4 "	0	0	0	0	0
	5 "	0	1	2	1	0
20	1 30MM, IV	0	0	0	0	0
	2 "	0	0	0	0	0
	3 "	0	0	0	0	0
	4 "	0	2	3	2	0
	5 "	2	3, 5	5	3	0
25	1 15MM, IV	0	0	0	0	0
	2 "	0	0	0	0	0
	3 "	5	8	13	20	+
	4 "	5	10	20	25	+
	5 "	6	14	25	35	+
30	1 30MM, SC	0	0	0	0	0
	2 "	0	0	0	0	0
	3 "	0	0	0	0	0
	4 "	2	4	5	2	0
	5 "	2	7	10	3	0
35	1 Sólo K ^b /OVA	0	0	0	0	0
	2 "	0	0	0	0	0
	3 "	0	6	12	5	10
	4 "	3	8	18	10	20
	5 "	2	10	20	20	30
40	1 Control	3	10	20	>50	+
	2 "	4	18	30	>50	+
	3 "	6	18	30	>50	+
	4 "	7	24	35	>50	+
	5 "	7	24	40	>50	+

IP = intraperitoneal; IV = intravenosa; SC = subcutánea; * = medición difícil debido al tamaño, o muerte del animal.

B. Tratamiento de la gripe

Por ejemplo, pueden generarse poblaciones de CD8 específicas para la gripe de acuerdo con las técnicas descubiertas en la presente invención, y probarse efectivas para proteger individuos contra la infección de gripe letal. La CD8 reactiva contra el virus, derivada del cebado con péptido *in vitro*, es capaz de proporcionar protección *in vivo*, y sugiere que la estimulación primaria de CD8 *in vitro* puede probarse útil en el diseño de una variedad de vacunas antivirales y antiretrovirales.

C. Cebado *in vivo* de ratones con células de *Drosophila* transfectadas con la Clase I

La inyección de 50×10^6 células de *Drosophila* intraperitonealmente (IP) condujo a la inducción de CD8 específicas. La detección de este cebado se realizó usando un análisis de dilución limitada. La frecuencia de las CD8 específicas para OVA fue de aproximadamente 10^6 en ratones “ingenuos”. Después de inyectar células de *Drosophila* recubiertas con péptido, la frecuencia es aproximadamente 10^3 (no se muestran los datos).

La Figura 8 (A y B) ilustra el cebado *in vivo* con células de *Drosophila* transfectadas, en donde las que responden son esplenocitos de ratón C57BL/6. En 8A, algunas de las células están fijadas; en 8B, las células de *Drosophila* están todas sin fijar.

Para una respuesta de CD8 secundaria, se cebaron ratones C57BL/6 mediante una inyección IP de células de *Drosophila* (5×10^7) y se ensayaron 5-15 días después de la inmunización. (Ver Figura 8B). La inducción de CD8 activadas *in vivo* aparentemente estimula el rechazo de tumores.

En otro experimento, se inyectaron subcutáneamente ratones C57BL/6 con 3MM de EL4 OVA. Cinco días más tarde, los ratones del grupo I recibieron una inyección subcutánea de 50MM de células de *Drosophila* (vivas) expresando K^b/OVA; los ratones del grupo II recibieron una inyección subcutánea de células de *Drosophila* fijadas expresando K^b/OVA; los ratones del grupo III fueron el grupo control y no recibieron inyección adicional alguna el día 5. Los resultados del experimento se ilustran en la Figura 9, la cual muestra que los ratones del grupo I sobrevivieron durante más tiempo y sobrevivieron en mayor número.

Las CD8 primarias se indujeron mediante Clase I cargada con péptido en células de *Drosophila* y en ratones B6 no cebados. Las CD8 se estimularon una vez *in vitro* con células de *Drosophila* cultivadas durante 36 horas a 22°C, incubadas con diferentes concentraciones de péptidos OVA. La cantidad mínima final de péptido es aproximadamente de 20 µg/ml. Las efectoras se recolectaron y ensayaron sobre células RMA-S con 50 µg de péptidos. Las poblaciones de CD8 fueron capaces de reconocer RMA-S OVA-8. (Ver Figuras 6A y B).

En otro experimento, se degradó proteína ovoalbúmina con la endoproteinasa Glu-C (procedente de *Staph. aureus*; Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). La mezcla se añadió a cultivo de células de *Drosophila* con MHC de ratón. Después de aproximadamente 5 días, las células CD8 se expusieron a las efectoras; un cierto número de células CD8 fueron capaces de reconocer RMA-S OVA-8.

D. Valoración del péptido a nivel de células diana

Estudios recientes han demostrado que los péptidos de 9 aminoácidos de longitud están presentes como una especie menor en las preparaciones de péptidos sintéticos. Aquellos más largos de 9 aminoácidos se unen con baja afinidad a la molécula del MHC de la Clase I H-2K^b. Los experimentos de valoración de péptido mostraron que una concentración 50 veces inferior de un péptido 9-mero que de un péptido 16-mero es suficiente para la inducción de respuesta de células T. La misma valoración de péptido se llevó a cabo para la sensibilización de células diana. Los resultados indican que la sensibilización de células se consigue con una concentración de péptido aproximadamente 1000 veces menor que la requerida para la inducción de una respuesta *in vitro*.

E. Generación de CD8 en ratones transgénicos

En este estudio se usaron ratones transgénicos expresando HLA 2.1, HLA B7 y HLA B27. Los esplenocitos de los ratones se cultivaron con células de *Drosophila* que expresaban el HLA sinérgico (respectivamente, A2.1, B7 y B27). Las respuestas CD8 específicas se generaron contra tres péptidos del VIH. (Ver Figuras 10A, B y C).

En estos estudios se usaron ratones C57BL/6 (H2^b) y Balb/c (H2^d) emparentados, así como varios ratones transgénicos. Los ratones transgénicos incluían los siguientes. Los ratones transgénicos B7 se produjeron en laboratorio como sigue. En resumen, se microinyectó un clon HLA-B7 genómico (incluyendo varios centenares de pares de bases de las regiones flanqueantes 5' y 3') en embriones de ratón B6 × SJL (Scripps Research Institute Transgenic Facility, La Jolla, CA). La línea transgénica B7 ha sido cruzada de nuevo con C57BL/6 (H2^b) (Scripps Research Institute Transgenic Facility, La Jolla, CA). Los ratones transgénicos B27 pueden producirse de acuerdo con procedimientos conocidos; los nuestros se produjeron inyectando clones genómicos en embriones B6 × SJL y cruzándolos de nuevo los mismos con C57BL/6 (Scripps Research Institute Transgenic Facility, La Jolla, CA). (Ver también Krimpenfort *et al.*, *EMBO J.* 6(8):1673 (1987), para otro procedimiento de generar ratones transgénicos B27). Los ratones transgénicos de microglobulina β2 y los ratones transgénicos de A2-1 se produjeron de forma similar usando técnicas conocidas (ver, por ejemplo, Irwin *et al.*, *J. Exp. Med.* 170:1091-1101 (1989)).

F. Generación de CD8 específicas para VIH en humanos

Se ensayaron PBL procedentes de donantes negativos por su capacidad para generar CD8 específicas contra dos péptidos del VIH. Estos donantes eran HLA A2, HLA B7 o HLA B27. Después de 5 días de cultivo, pudo detectarse una actividad CD8 muy intensa en el cultivo contra ambos péptidos del VIH. (Ver Figuras 11A, B y C).

Los PBL humanos se aislaron mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Piscataway, NJ). Los linfoblastos de PLB se almacenaron en nitrógeno líquido después de congelarlos en FBS conteniendo un 10% de DMSO. La viabilidad celular y las funciones de linfocitos se conservaron.

Las células CD8 específicas para un péptido se generaron en cultivo primario sinérgico con células de *Drosophila* que expresaban el complejo sinérgico de la Clase I-péptido. Estos cultivos se establecieron con 3×10^7 células de bazo de ratón, o PBL humanos, que respondían, y 10^6 células vivas de *Drosophila*, en 20 ml de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 5×10^{-5} M de β -mercaptoetanol y 5% de FBS, en un frasco de 25 cm² en vertical, a 37°C en 7% de CO₂. Las células CD8 se recolectaron después de 5 días en cultivo.

En otro experimento, los PBL humanos se recolectaron y estimularon, a lo largo de un período de 5 días, con células de *Drosophila* que expresaban el HLA A2.1 humano y se cargaron con el péptido POL de VIH. Los PLB estimulados se ensayaron a continuación en células Jurkat infectadas con VIH. Los resultados de los experimentos se ilustran en la Figura 12. Los PLB humanos estimulados *in vitro* fueron claramente capaces de reconocer el A2.1 POL sobre células infectadas y de matar dichas células.

Ejemplo 6

Aplicaciones terapéuticas

A. Banco de moléculas de la Clase I

Puede establecerse y mantenerse un depósito o “banco” de líneas celulares de *Drosophila*, expresando cada línea celular uno de las 50 a 100 moléculas más comunes de la Clase I. Los cADN codificando estas proteínas pueden clonarse en base a variantes del HLA obtenidas a partir de líneas celulares conteniéndolo -por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (ver Ennis *et al.*, *PNAS USA* 87:2833-2837 (1990))- e insertarse en el vector apropiado, tal como un vector de expresión en insecto, para generar líneas celulares expresando cada variante de HLA. El ensayo de acuerdo con el protocolo siguiente puede usarse, por ejemplo, para determinar qué péptidos derivados del virus de elección se unen con la mejor de las diferentes moléculas de la Clase I. Los diversos cultivos pueden marcarse apropiadamente o catalogarse para indicar qué moléculas de la Clase I son las mejores para su uso con péptidos, alternativamente, pueden establecerse cultivos transitorios según se necesitara. Tal como se ha discutido en la presente invención, después de aproximadamente 48 horas de incubación de un cultivo de células de insecto con un vector, ese cultivo es aparentemente capaz de expresar moléculas del MHC vacías, las cuales pueden cargarse con el(los) péptido(s) de elección para el propósito de activar células CD8.

B. Preparación de líneas celulares “especiales”

Después del tipado del HLA, si no hay disponibles células de *Drosophila* expresando el HLA preferido, los cADN codificando el HLA preferido pueden clonarse a través del uso de la reacción en cadena de la polimerasa. Los cebadores descubiertos en la sección B.1 anterior (SEC N° ID 1 a SEC N° ID 12) pueden usarse para amplificar los cADN de HLA-A, -B, -C, -E, -F o -G apropiados en reacciones separadas, los cuales pueden clonarse a continuación y secuenciarse según se describe en los procedimientos descubiertos en el Ejemplo 1, SECCIÓN anterior. A continuación se purifica el ADN a partir de la reacción de la PCR usando un equipo Gene Clean (Bio 101, San Diego, CA) y se liga directamente en el sitio SmaI de pRmHa-3. Se aíslan clones individuales, se verifican las secuencias, y se expresan líneas celulares de *Drosophila* estable expresando el HLA establecido. Alternativamente, puede cultivarse a gran escala una población conjunta de plásmidos recombinantes, y purificarse el ADN mediante gradientes de cloruro de cesio. El ADN purificado se usa entonces para transfectar células de Schneider usando técnicas de precipitación con fosfato cálcico. Transcurridas 24 horas, se lavó el precipitado se elimina mediante lavado y se reemplaza con medio Schneider reciente que contiene CuSO₄ 1 mM. Cuarenta y ocho horas más tarde, la población general de células transfectadas transitoriamente se usa para la activación *in vitro* de CD8 después de su incubación con péptidos sinérgicos o digeridos de proteasa de proteínas específicas.

A continuación pueden establecerse líneas celulares estables expresando el HLA clonado en las células de *Drosophila*. Alternativamente, una población de células de insecto, expresando transitoriamente una población general de moléculas recombinantes clonadas procedentes de la reacción de la PCR, pueden usarse para la activación *in vitro* de CD8.

También es posible activar CD8 de haplotipo específico *in vitro* usando células de insecto que expresan MHC de la Clase I incubadas con péptidos, donde el MHC expresado por la línea celular no es el elemento expresado *in vivo*. Esto proporciona una oportunidad única para proliferar células CD8 que reconocen un antígeno específico asociado con un MHC particular, el cual no sería posible *in vivo* debido a restricciones alélicas. Por ejemplo, un péptido (NP) procedente de la proteína nuclear del virus de la gripe está ordinariamente restringido a la molécula D^b; sin embargo, hemos hallado que un péptido tal puede unirse a la K^b (aunque más débilmente que a la D^b) y puede generar un grado de estabilidad térmica para la K^b (ver Figura 3). Además, las células de *Drosophila* expresando K^b preincubadas con el péptido NP, y cocultivadas con esplenocitos procedentes de un ratón B6, resultan en la activación *in vitro* de CD8, las cuales reconocen específicamente la molécula de K^b asociada con el péptido NP. Además, el experimento recíproco, usando un péptido restringido a K^b (OVA) derivado de la ovalbúmina, y células de *Drosophila* expresando D^b, resultó en la proliferación de CD8 que reconocían específicamente D^b conteniendo el péptido OVA. Tales CD8 son capaces

de matar células (EL4 OVA) transfectadas con cADN codificando la proteína ovoalbúmina, indicando que, *in vivo*, algunas moléculas D^b son cargadas con el péptido OVA.

Por tanto, este sistema proporciona una oportunidad única para proliferar CD8 contra antígenos específicos presentados por una molécula de la Clase I, la cual, *in vivo*, no es el elemento de restricción para ese péptido. Aunque suficiente antígeno es presentado *in vivo* por dicha Clase I como para que la célula sea reconocida por la CD8 y destruida, no es bastante como para proliferar tales CD8 *in vivo*. Mediante la carga de moléculas de la Clase I vacías, expresadas por células de *Drosophila*, con péptido, somos presumiblemente capaces de superar la restricción *in vivo* proporcionando un exceso de péptido antigénico a la molécula de la Clase I en un entorno no competitivo, de tal forma que suficiente antígeno es presentado por la Clase I como para activar las CD8 específicas para que reconozcan este complejo.

C. Tratamiento del SIDA

Las células activadas *in vitro* pueden suministrarse a pacientes para su terapia *in vivo*. Preferiblemente, primero se determina el genotipo (haplotipo) de la Clase I del individuo. El tipado de tejidos convencional es apropiado para este propósito, y puede realizarse en el centro de tratamiento o mediante alguna operación comercial apropiada. Una vez que se ha(n) determinado el(los) tipo(s) de HLA del individuo, se discierne la mejor combinación de péptidos y moléculas de la Clase I apropiadas para el paciente individual, y se prepararan como se ha mencionado más arriba, y las células de *Drosophila* y péptidos apropiados se proporcionan para el tratamiento del paciente. Las células CD8 (T) en reposo o precursoras, procedentes de la sangre del paciente, se estimulan a continuación con el MHC cargado con péptido apropiado producido por el cultivo de células de *Drosophila*. Después de su activación, las células CD8 se reintroducen en el torrente sanguíneo del paciente, y se continua monitorizando el proceso morbo del paciente. Los procedimientos para retirar y reintroducir componentes celulares en el torrente sanguíneo son conocidos en la técnica, e incluyen procedimientos tales como los ejemplificados en la patente estadounidense n° 4.844.893 para Honsik *et al.*, y la patente estadounidense n° 4.609.915 para Rosenberg.

Pueden administrarse tratamientos adicionales, según fuera necesario, hasta que la enfermedad estuviera suficientemente resuelta. Protocolos de tratamiento similares son apropiados para su uso con otros individuos inmunodeprimidos, incluyendo los pacientes de transplantes, pacientes ancianos, y similares.

D. Tratamiento del cáncer

En los pacientes de cáncer se usa un procedimiento de tratamiento similar al descrito más arriba. No obstante, en tales pacientes, debería anticiparse que la terapia convencional para reducir la masa del tumor puede preceder a la terapia inmune descrita en la presente invención. Por tanto, se prefiere que las muestra de sangre procedentes de los pacientes putativos se obtengan y almacenen (por ejemplo, mediante congelación) antes de comenzar la terapia convencional tal como la radiación o quimioterapia, las cuales tienden a destruir las células inmunitarias. Puesto que pocas, si alguna, formas de cáncer surgen en respuesta directa a una infección viral, los péptidos diana para el tratamiento se observan menos fácilmente. No obstante, estudios recientes indican que las mutaciones en los oncogenes *ras*, *neu* y *p53* contribuyen al cáncer en tanto como el 50% de todos los casos de cáncer. Por tanto, los péptidos derivados de estas regiones mutadas de las moléculas son candidatos principales como dianas para la presente terapia. Siguiendo los protocolos descubiertos en la presente invención, puede determinarse y administrarse la mejor combinación de péptidos y moléculas de la Clase I para el paciente individual.

Por ejemplo, muchos tumores expresan antígenos que son reconocidos *in vitro* por células CD8 derivadas de los individuos afectados. Tales antígenos, que no se expresan en células normales, pueden, por tanto, identificarse, así como el tipo HLA que los presenta a las células CD8, para una inmunoterapia dirigida con precisión usando los procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, van der Bruggen *et al.* han descrito un antígeno cuya expresión está dirigida por un gen específico, antígeno que parece ser presentado por HLA A1 (*Science* 254:1643-1647 (1991)). Puesto que se han aislado y descrito varios antígenos de tumores humanos, ellos devienen buenos candidatos para las aplicaciones inmunoterapéuticas tal como se describen en la presente invención.

E. Terapias/conjugados combinados

Puede ser posible administrar las células CD8, activadas *in vitro* mediante procedimientos de la presente invención, conjuntamente con otros inmunógenos. Por ejemplo, puede administrarse el Inmunógeno Multivalente Grande, descubierto en la patente estadounidense n° 5.045.320, conjuntamente con células CD8 activadas.

También se contempla que citoquinas tales como la IL2 e IL4, las cuales median la diferenciación y activación de células T, pueden administrarse, puesto que las citoquinas son capaces de estimular la respuesta de células T contra células tumorales *in vivo*. Se cree que la IL2 juega un papel principal en el crecimiento y diferenciación de las precursoras de CTL (CD8) y en la proliferación de CD8. La administración de IL2 a pacientes con cáncer se asocia frecuentemente con una mejora en la respuesta anti-tumor, lo que probablemente esté relacionado con la inducción de células T específicas para el tumor. No obstante, los mejores efectos terapéuticos de la IL2 pueden obtenerse mediante administración continua de IL2 local en vez de sistémica, minimizando por tanto la toxicidad de IL2 y prolongado su actividad biológica. Por tanto, se sugiere en la presente invención que uno puede conseguir el suministro local a través de la transfección de células tumorales con una construcción de gen de la IL2.

El cADN de la IL2 se construye tal como describieron Karasuymaa y Melchers en *Eur. J. Immunol.* 18:97-104 (1988). La secuencia completa del cADD de la IL2 se obtuvo como un fragmento XhoI a partir del plásmido pBMGneo IL2 (ver Karasuymaa y Melchers, más arriba) y se ligó directamente en el sitio Sall en pRmHa-3. El plásmido pRmHa-3 recombinante, con el inserto en la orientación correcta (determinada mediante mapado de restricción con HindIII), se purificó mediante gradientes de cesio, y se usó para cotransfectar células Schneider 2 usando la técnica del fosfato cálcico. (Con este propósito se preparó una mezcla de ADN de plásmido: 10 μ g de pRmHa-3 conteniendo cADN de IL2, 6 μ g de cada uno de los plásmidos pRmHa-3 conteniendo cadena pesada de la Clase I, o microglobulina β 2, o 2 μ g de AND phshsneo). Se obtuvieron líneas celulares estables, las cuales son inducibles mediante CuSO₄, para expresar cadena pesada, microglobulina β 2, e IL2, mediante cultivo de los transfectantes en medio G418. Estas líneas celulares estables se recubrieron con péptido y se usaron en el ensayo *in vitro* tal como se ha descrito más arriba. Se observa que las células tumorales transfectadas con IL2 potencian la actividad de CTL (CD8) contra las células tumorales progenitoras y prescinden de las función auxiliar de T y CD4 en la inducción de una respuesta anti-tumor o citotóxica *in vivo*. Por tanto, se sugiere en la presente invención el incremento del potencial del sistema de *Drosophila* mediante la cotransfección con el gen de la IL2.

Se pretende que lo precedente sea ilustrativo de la presente invención, pero no limitante. Pueden efectuarse numerosas variaciones y modificaciones sin apartarse del verdadero espíritu y ámbito de la invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para producir una célula T CD8⁺ activada *in vitro*, comprendiendo el procedimiento poner en contacto, *in vitro*, una célula T CD8⁺ con una molécula del MHC de la Clase I humana cargada con antígeno y expresada sobre la superficie de una célula de insecto durante un período de tiempo suficiente para activar, de una manera específica para el antígeno, la célula T CD8⁺.
- 10 2. Procedimiento de la reivindicación 1, en la cual el procedimiento comprende además:
- (a) separar la célula T CD8⁺ activada de la molécula del MHC de la Clase I humana cargada con antígeno; y
- (b) suspender la célula T CD8⁺ activada en un portador o excipiente aceptable.
- 15 3. Procedimiento de la reivindicación 1 ó reivindicación 2, en la cual la célula de insecto es una célula de *Drosophila*.
4. Procedimiento de la reivindicación 1 ó reivindicación 2, en la cual la célula de insecto es una célula de gusano soldado.
- 20 5. Procedimiento de la reivindicación 1 ó reivindicación 2, en la cual la célula de insecto es una célula de polilla, gusano de seda o de mosquito.
- 25 6. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual la célula T CD8⁺ procede de un humano.
7. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual la célula T CD8⁺ comprende un gen del MHC de la Clase I humano bajo el control de un promotor inducible, y un gen expresable de la β -2-microglobulina humana.
- 30 8. Procedimiento de la reivindicación 7, en la cual las moléculas vacías del MHC de la Clase I se expresan sobre la superficie de la célula de insecto, y la célula de insecto se pone en contacto con un péptido antígeno.
9. Procedimiento de la reivindicación 7, en la cual el promotor inducible es un promotor de metalotioneína.
- 35 10. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la cual el gen del MHC de la Clase I humano y el gen de la β -2-microglobulina humana se transfectan dentro de la línea celular de insecto.
11. Procedimiento de la reivindicación 7, en la cual el antígeno del MHC de la Clase I humano es B7, B27 ó A2.1.
- 40 12. Procedimiento de la reivindicación 8, en la cual el péptido se deriva de una proteína vírica.

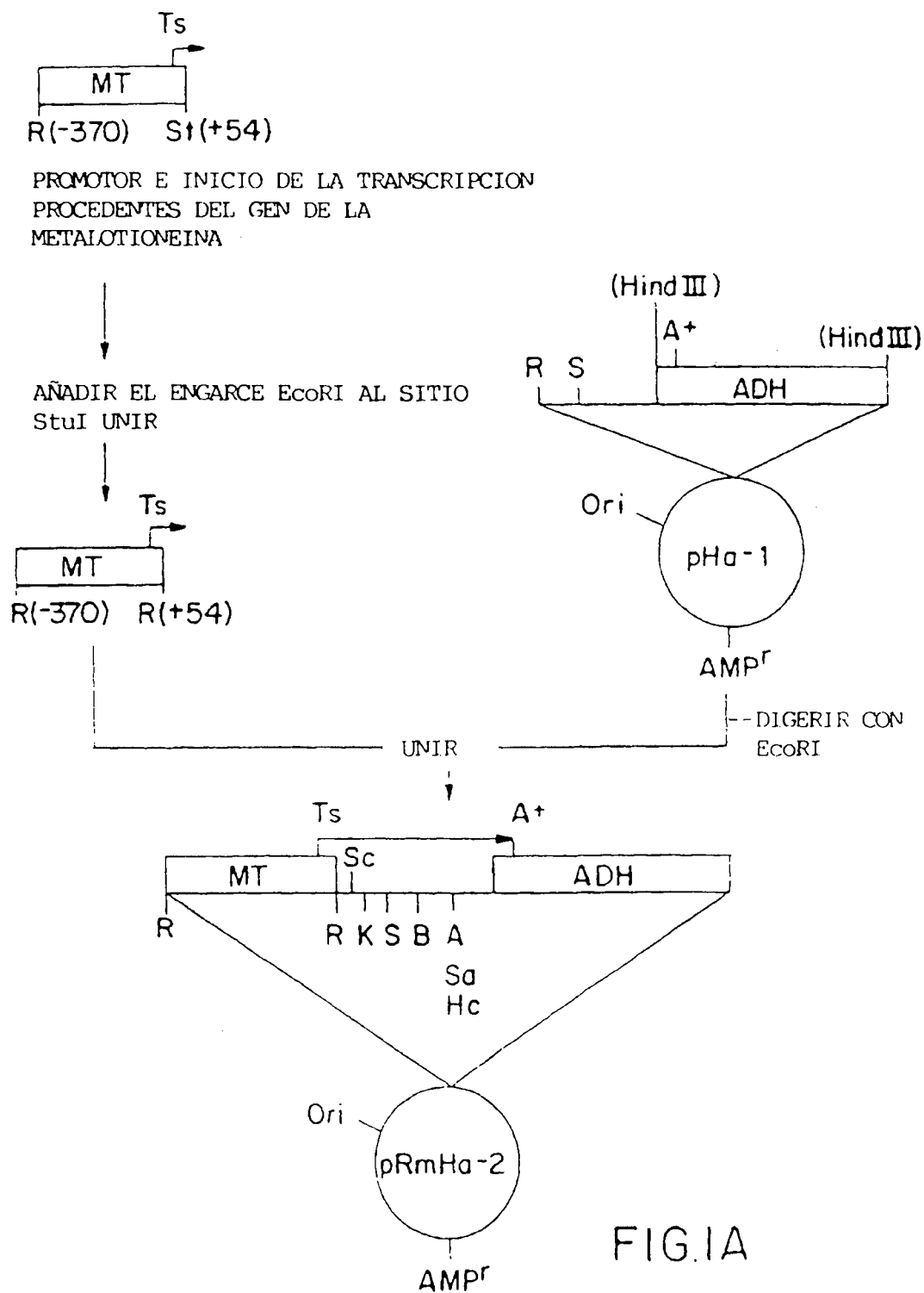


FIG.1A

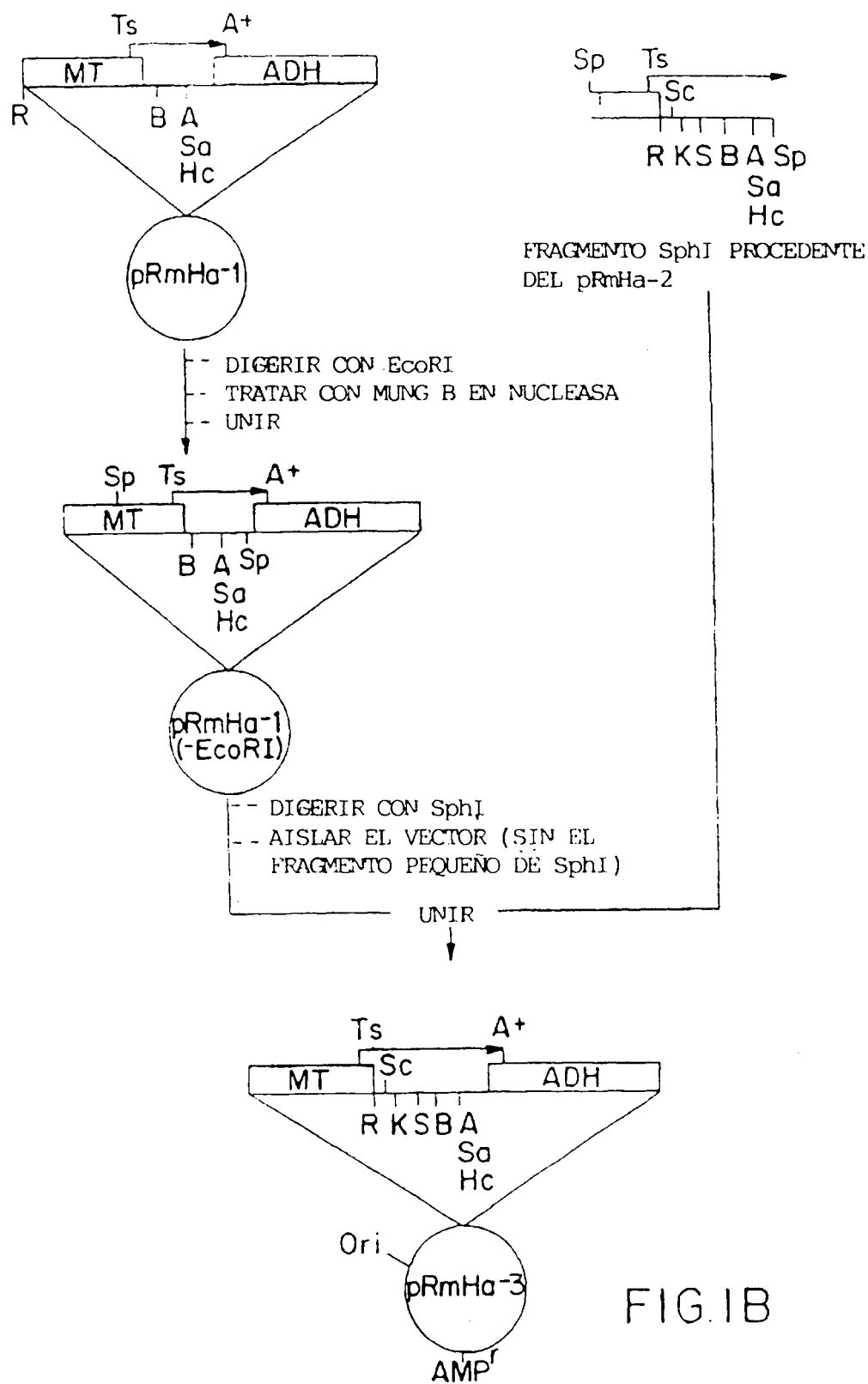
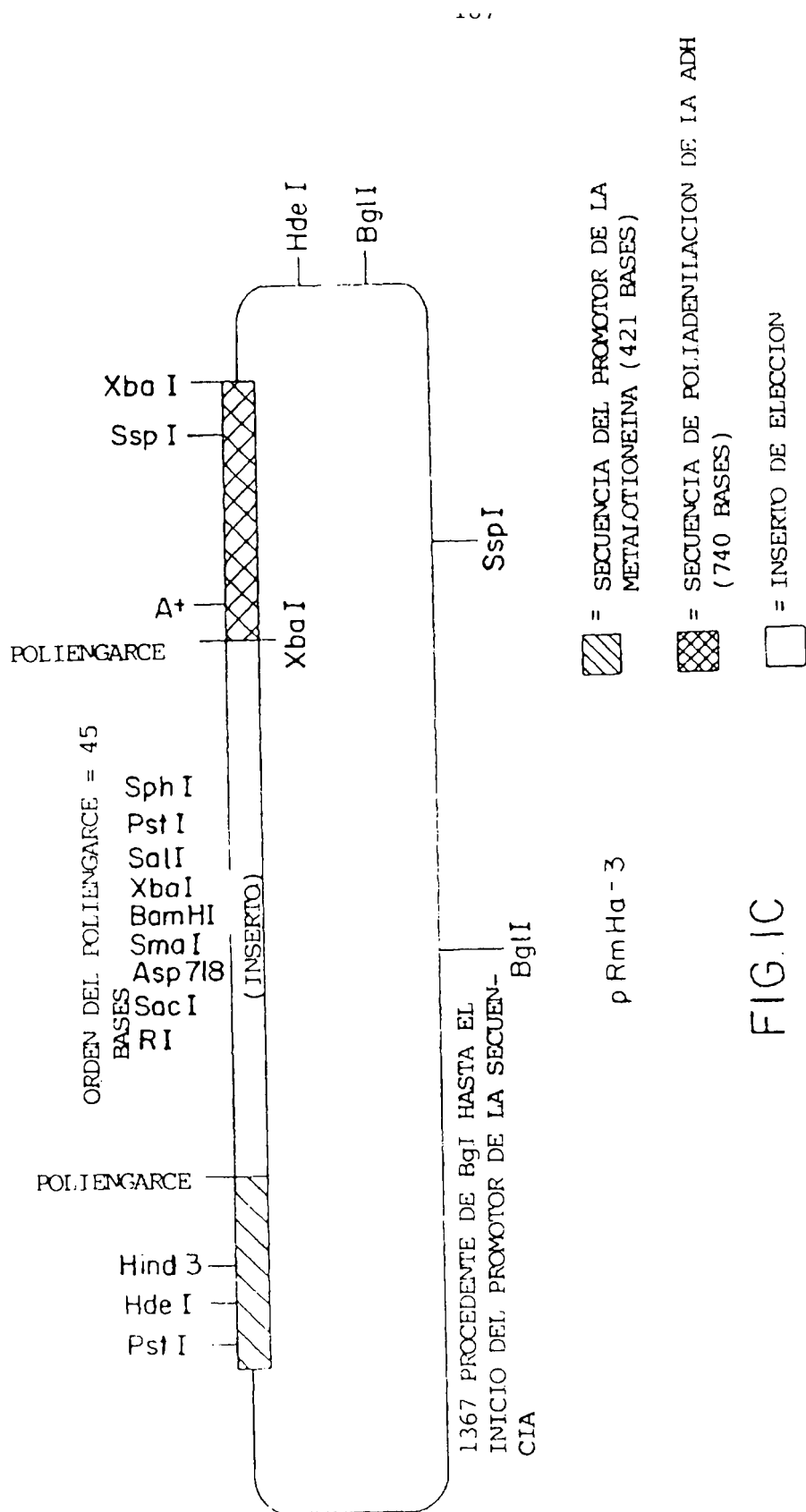


FIG. 1B



Kb/mb2		Db/mβ2	
ANTICUERPO Y3 (ESPECIFICO PARA α1/α2 Kb)		ANTICUERPO B22 (ESPECIFICO PARA α1/α2 Db)	
4°C	37°C	4°C	37°C
- Ova 8 NP 9	- Ova 8 NP 9	- Ova 8 NP 9	- Ova 8 NP 9

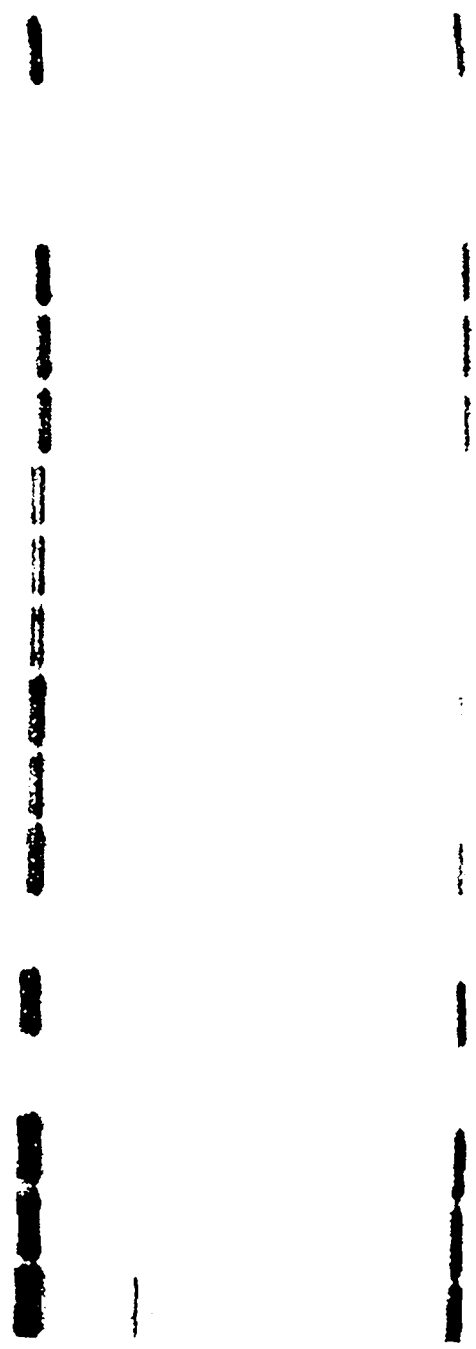
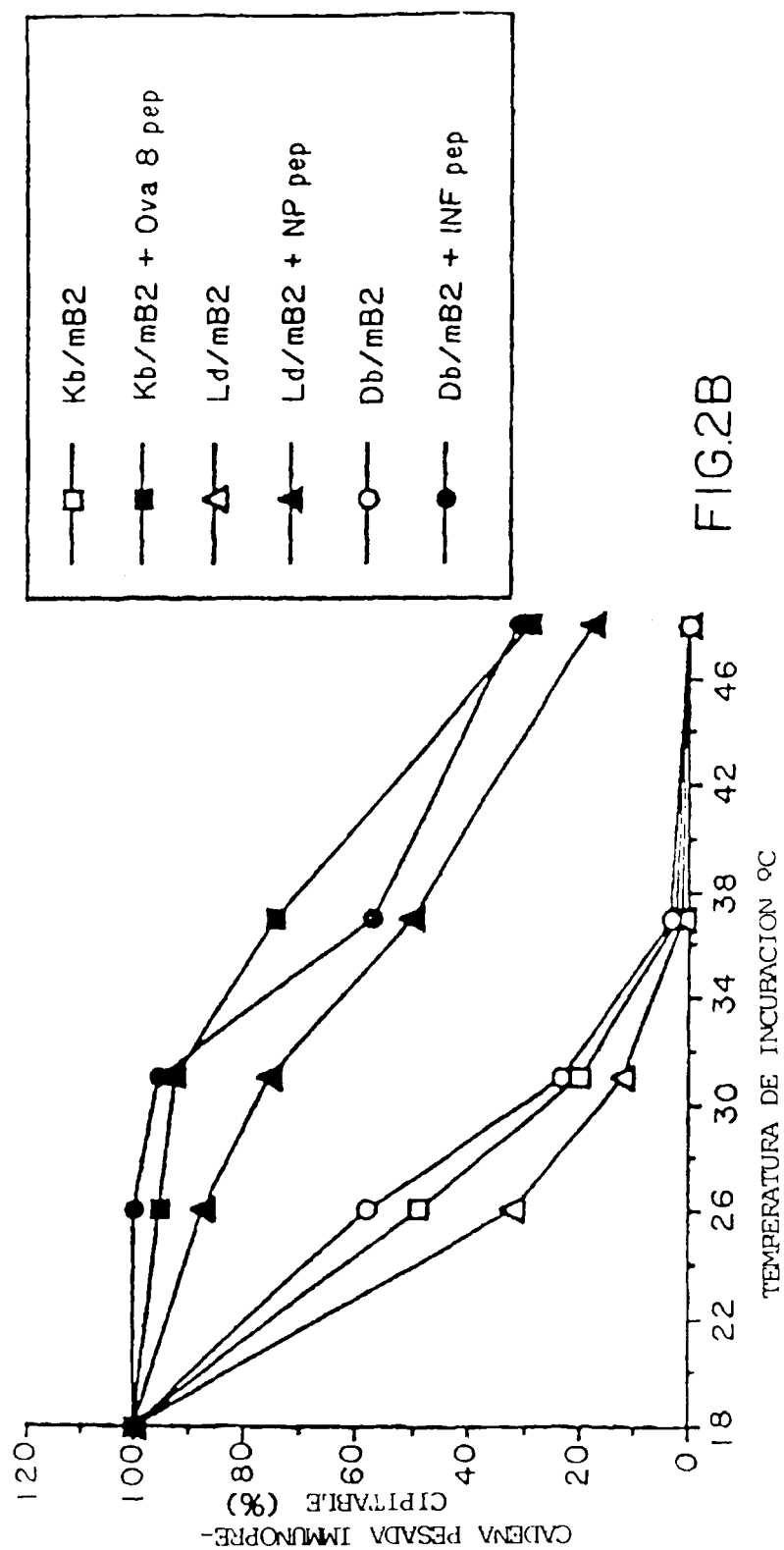


FIG. 2A



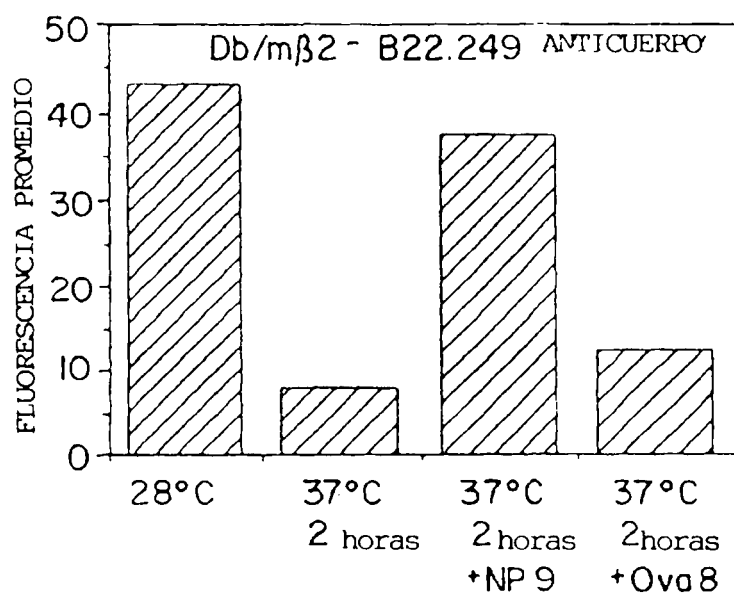


FIG.3A

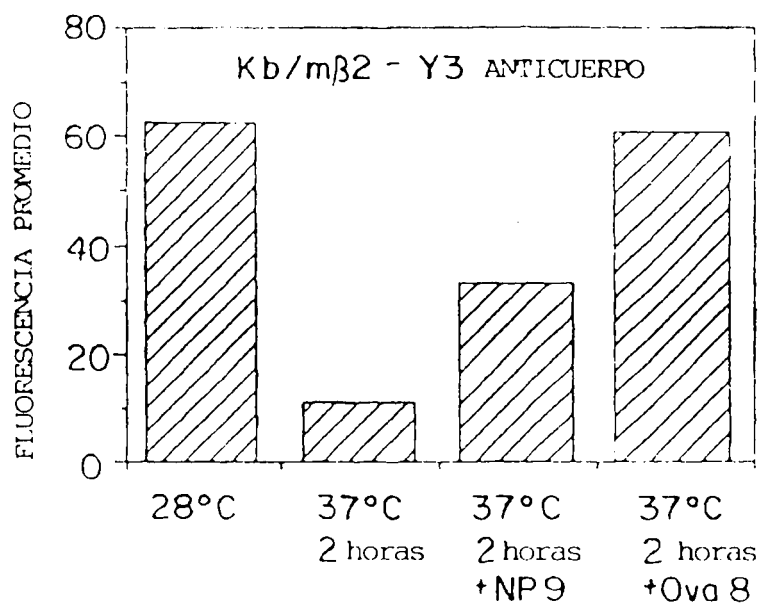
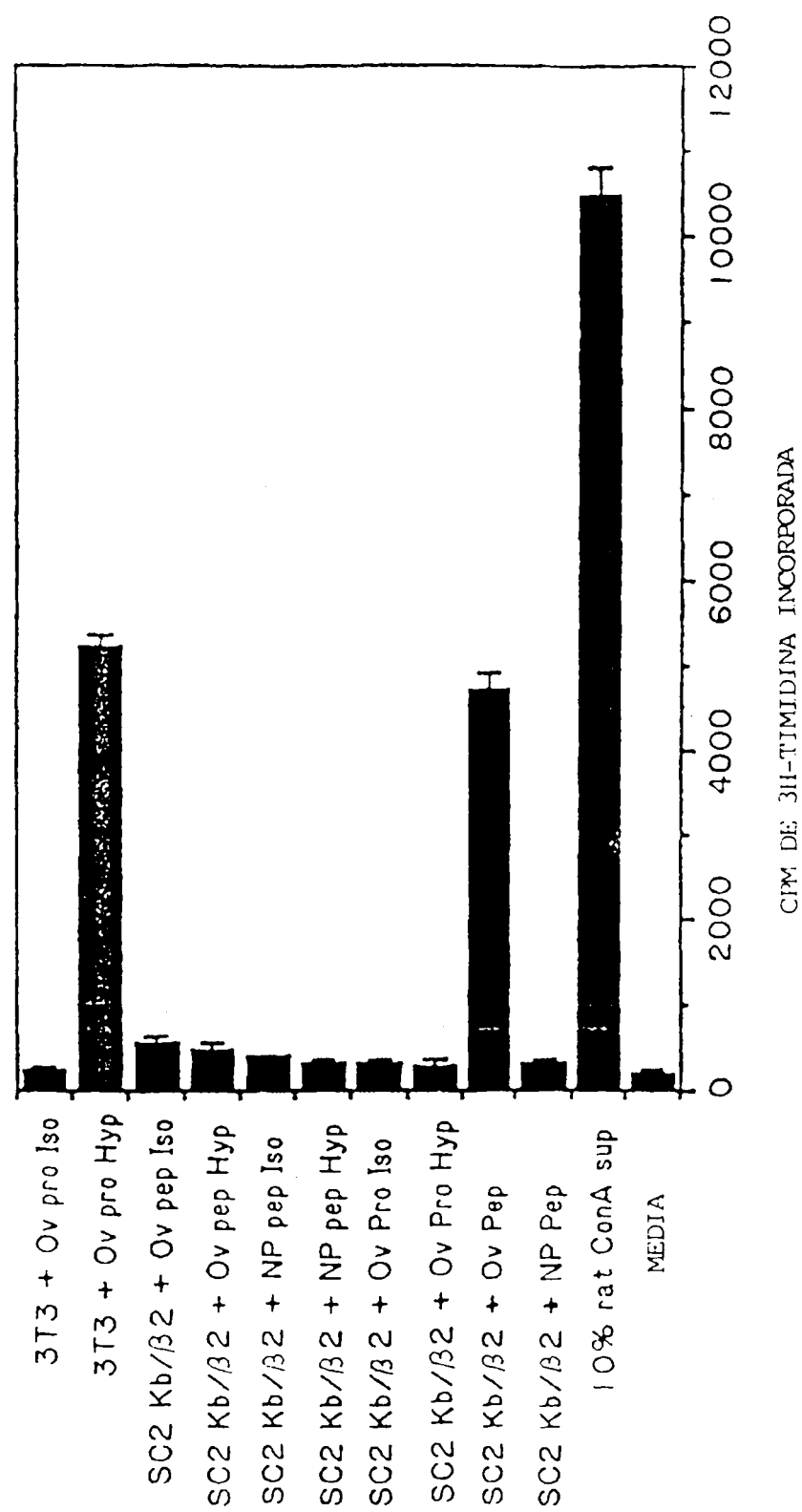


FIG.3B

FIG. 4



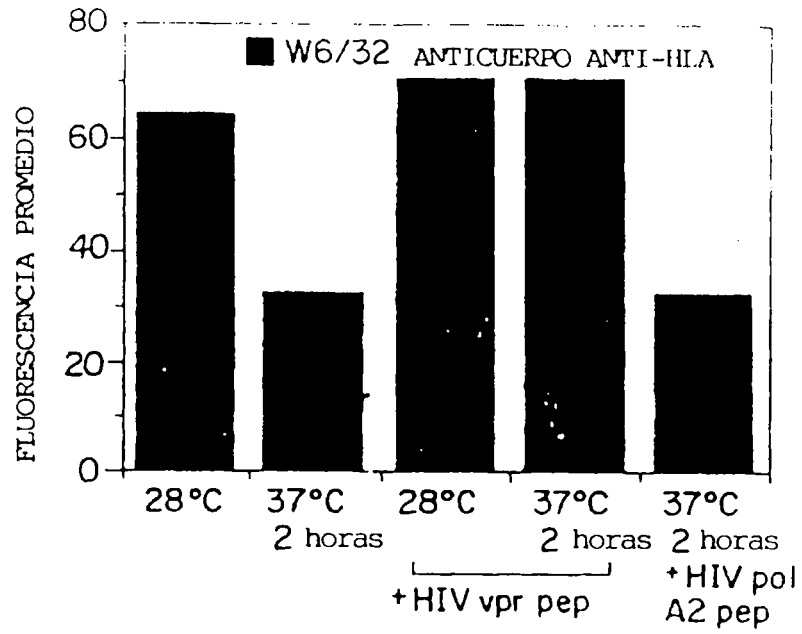


FIG.5A-1

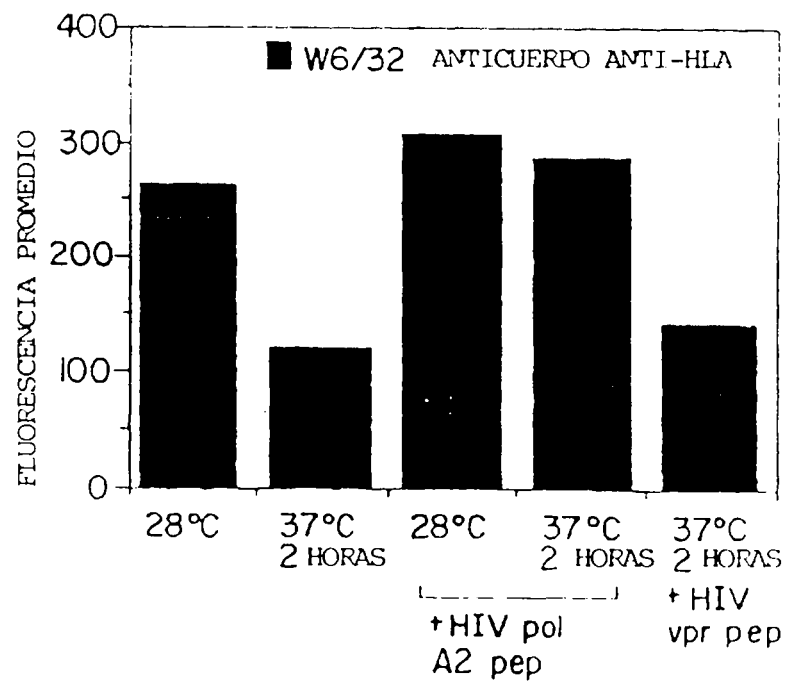


FIG.5A-2

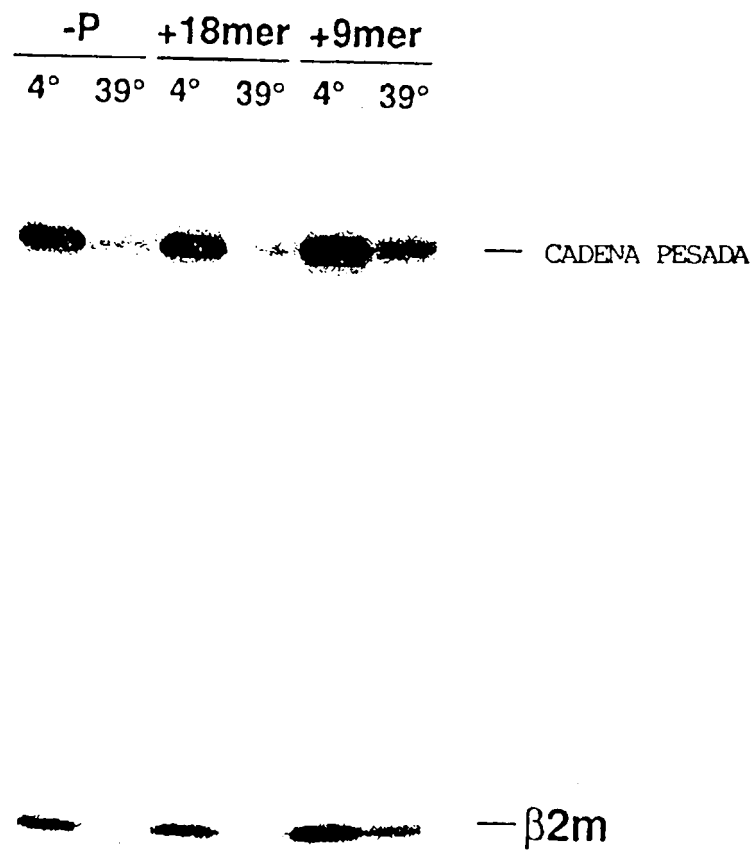


FIG. 5B

ES 2 272 611 T3

ESTABILIZACION DEL H1A A2,2 EN LISADOS
CON TRITON X100 POR PARTE DEL PEPTIDO

4°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C
A	B	C	D	E	F

 — CADENA PESADA

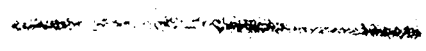
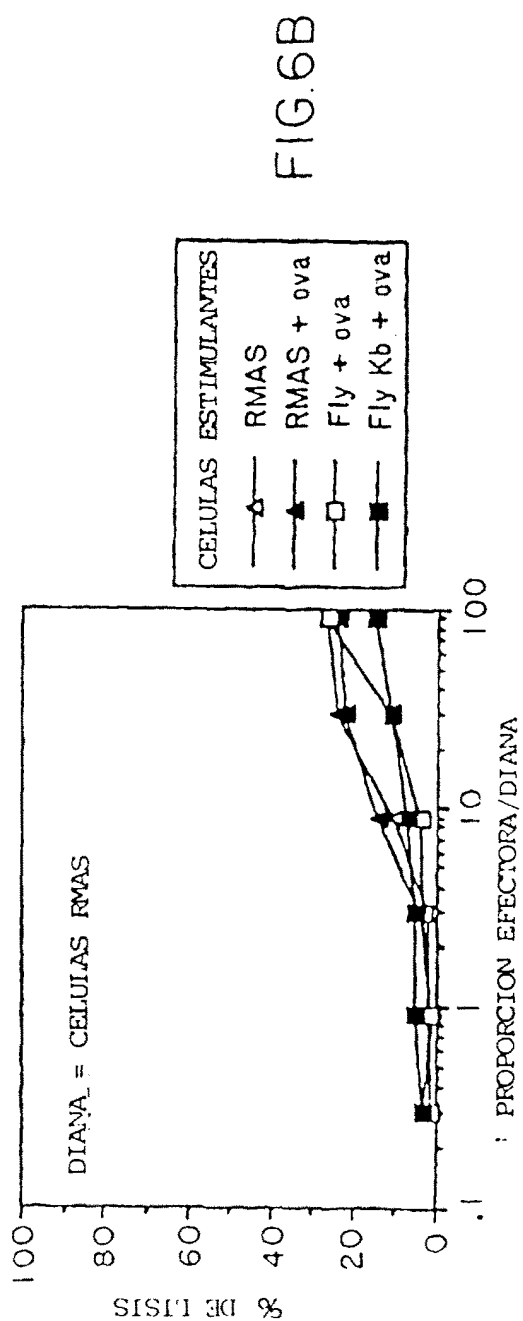
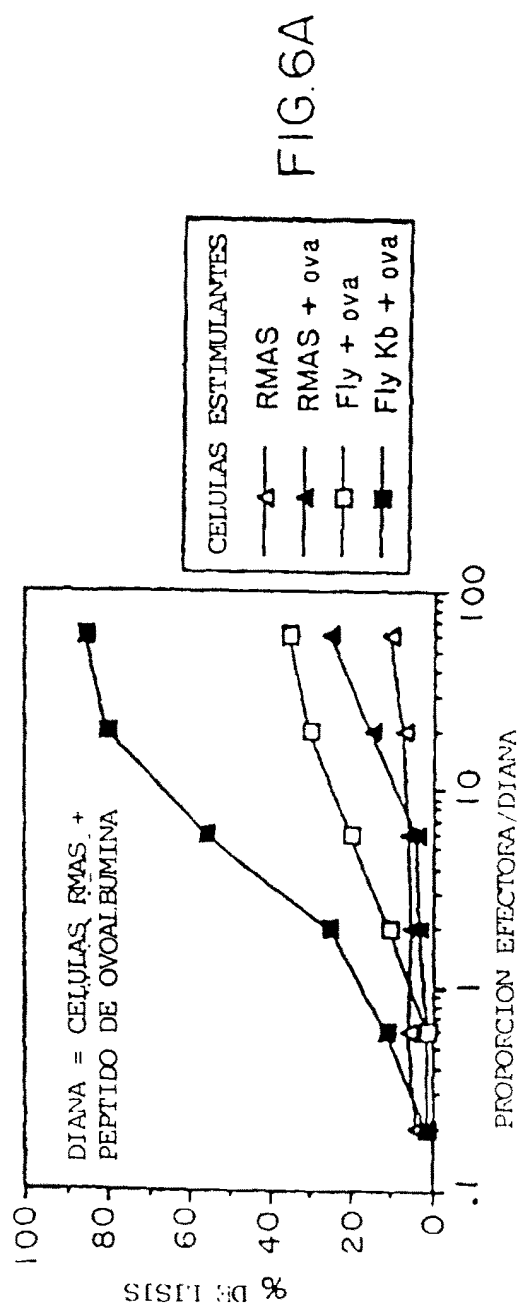
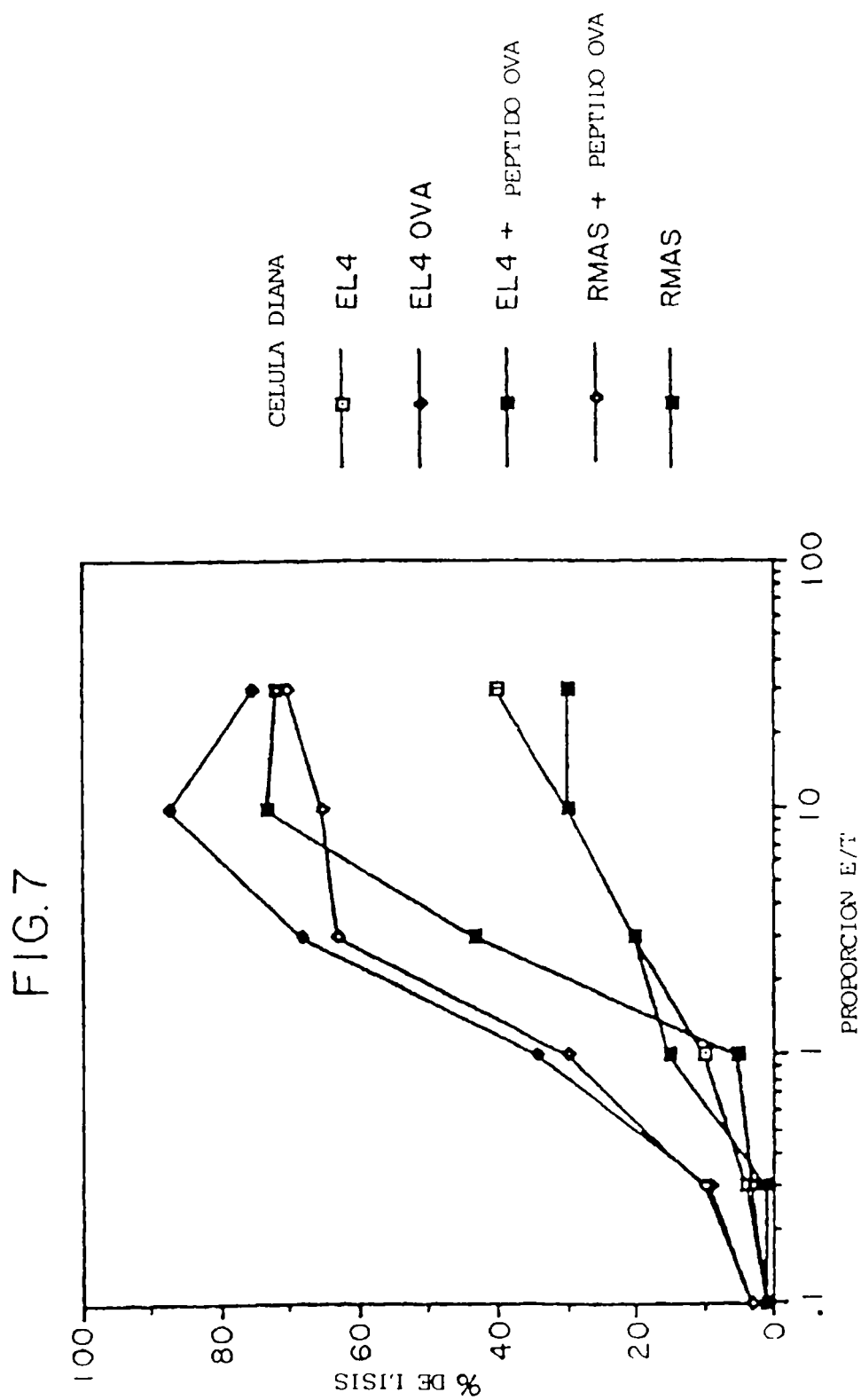
 — β2M

FIG. 5C





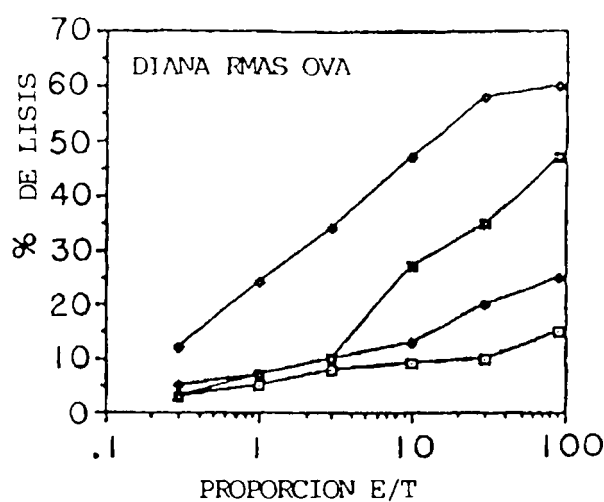


FIG.8A

CELULOSA DE MOSCA ESTIMULANTE

- KB
- KB OVA FIXED
- KB OVA FIXED + S/N
- ◆— KB OVA

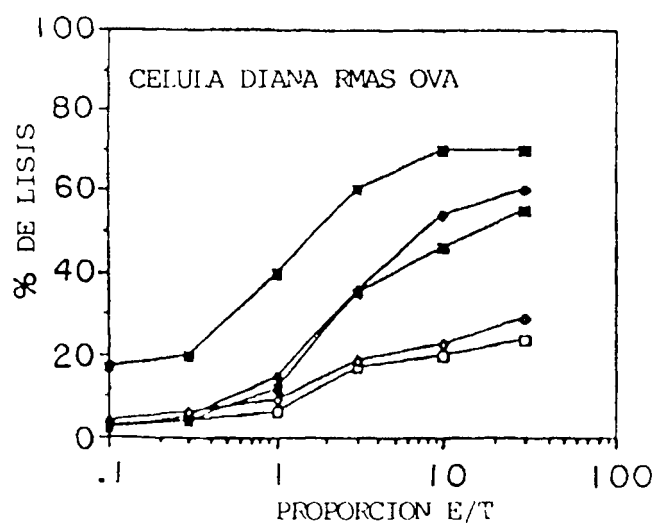
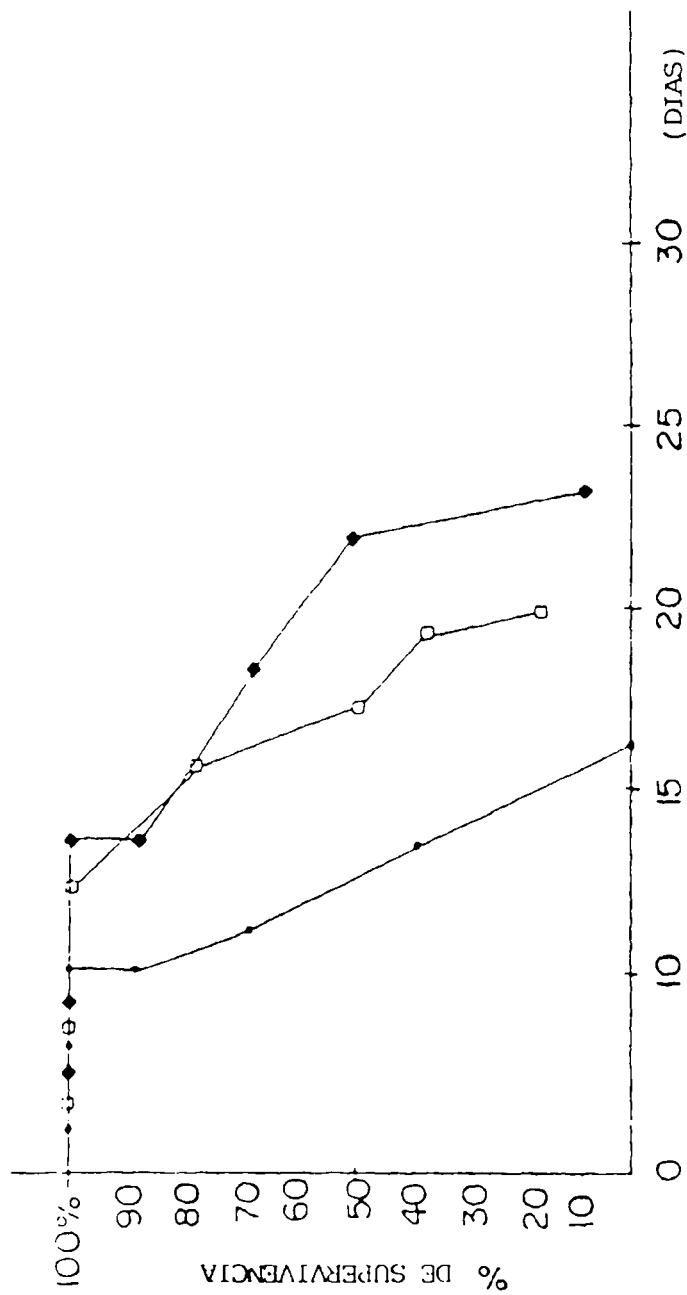


FIG.8B

CELULOSA DE MOSCA ESTIMULANTE

- KB
- KBOVA IN VIVO/KB OVA IN VITRO
- KB OVA
- ◆— KBOVA IN VIVO/DBOVA IN VITRO
- DB OVA

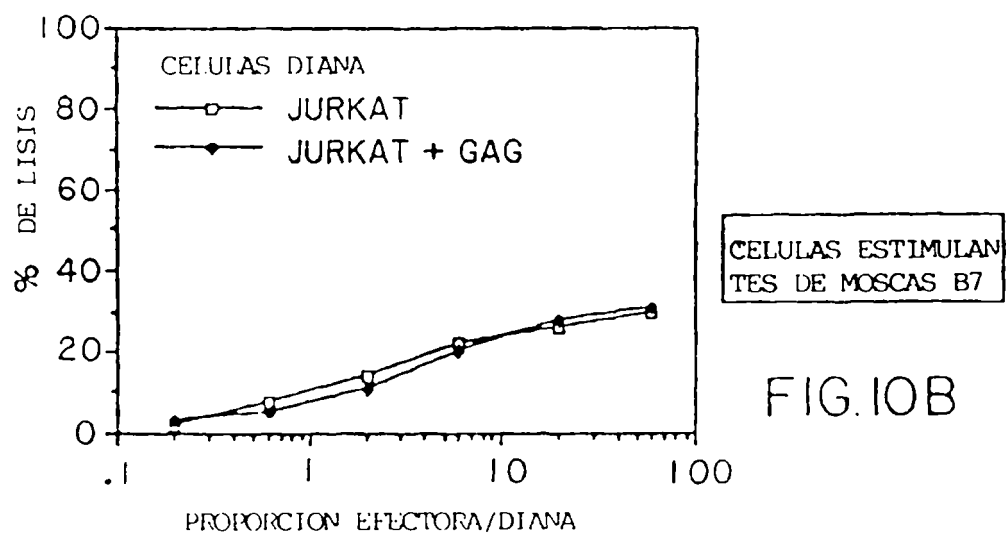
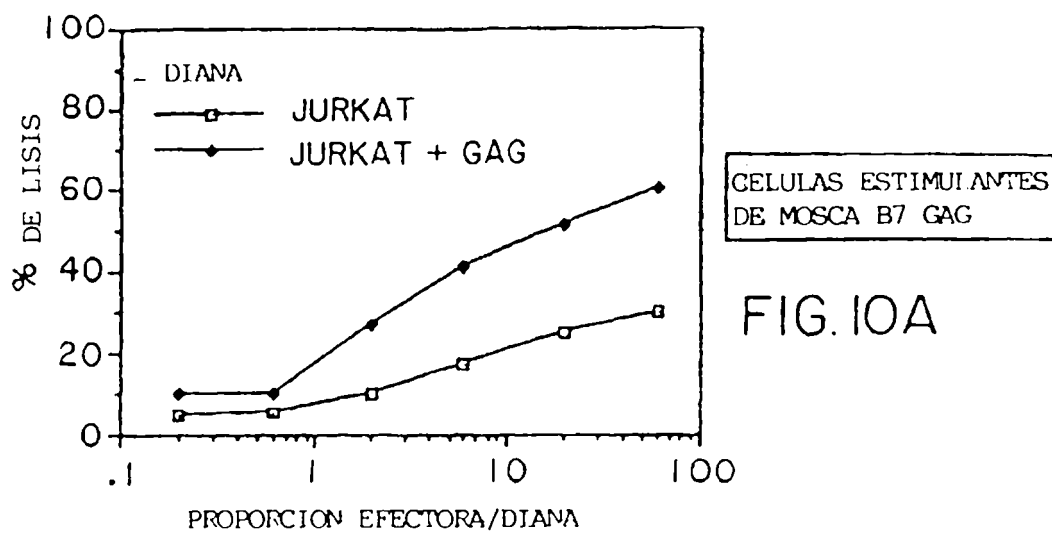


◆ I - INYECCION SUBCUTANEA DE 50MM DE CELULAS VIVAS DE DROSOFILA EXPRESANDO KB/OVA, 5 DIAS DESPUES DE LA INYECCION DE EL4

□ II - INYECCION SUBCUTANEA DE 50MM DE CELULAS DE DROSOFILA FIJADAS CON KB/OVA, 5 DIAS DESPUES DE LA INYECCION DE EL4

● III - GRUPO CONTROL; SIN INYECCION ADICIONAL DESPUES DE LA INYECCION DE EL4

FIG.9



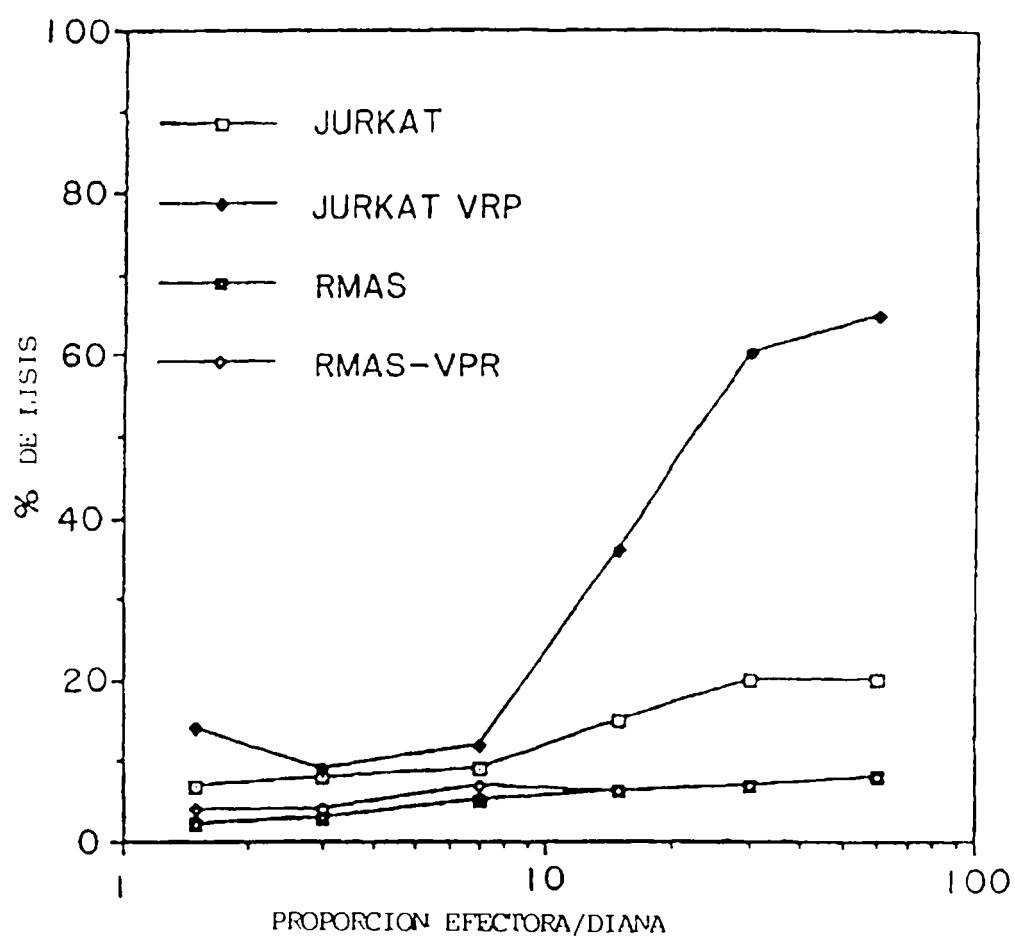


FIG.IOC

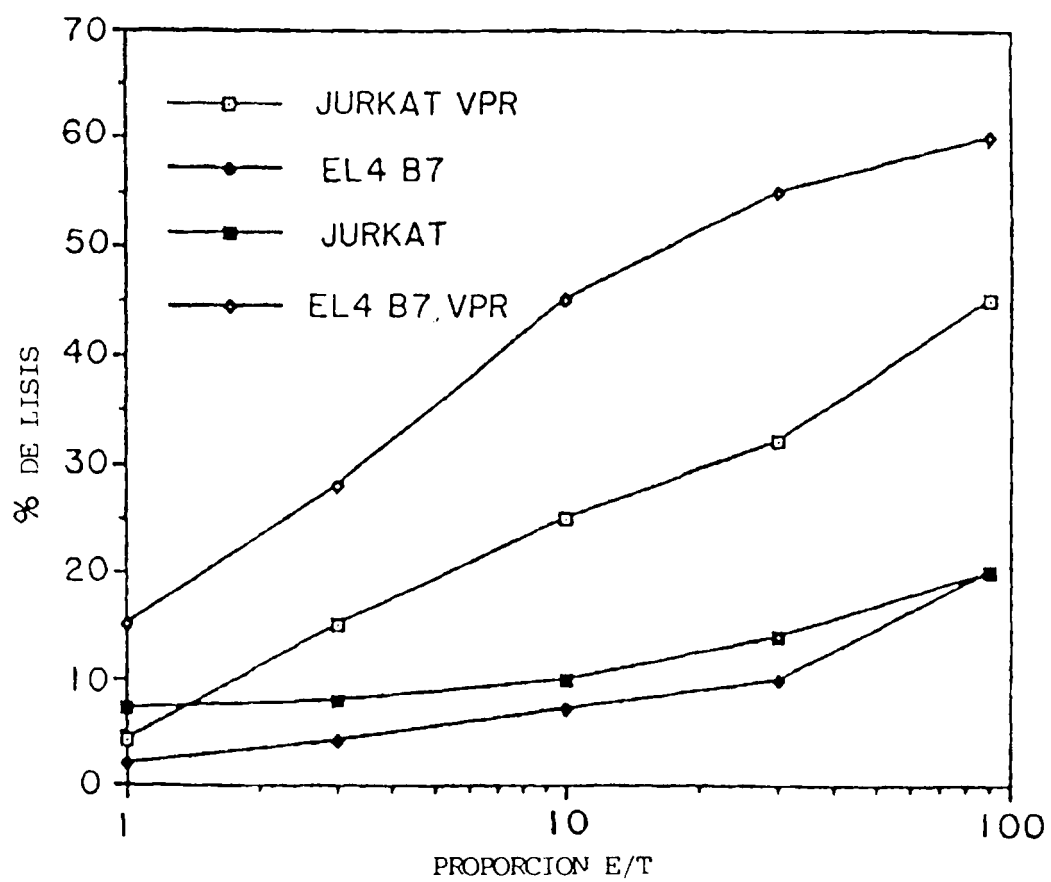


FIG.IIA

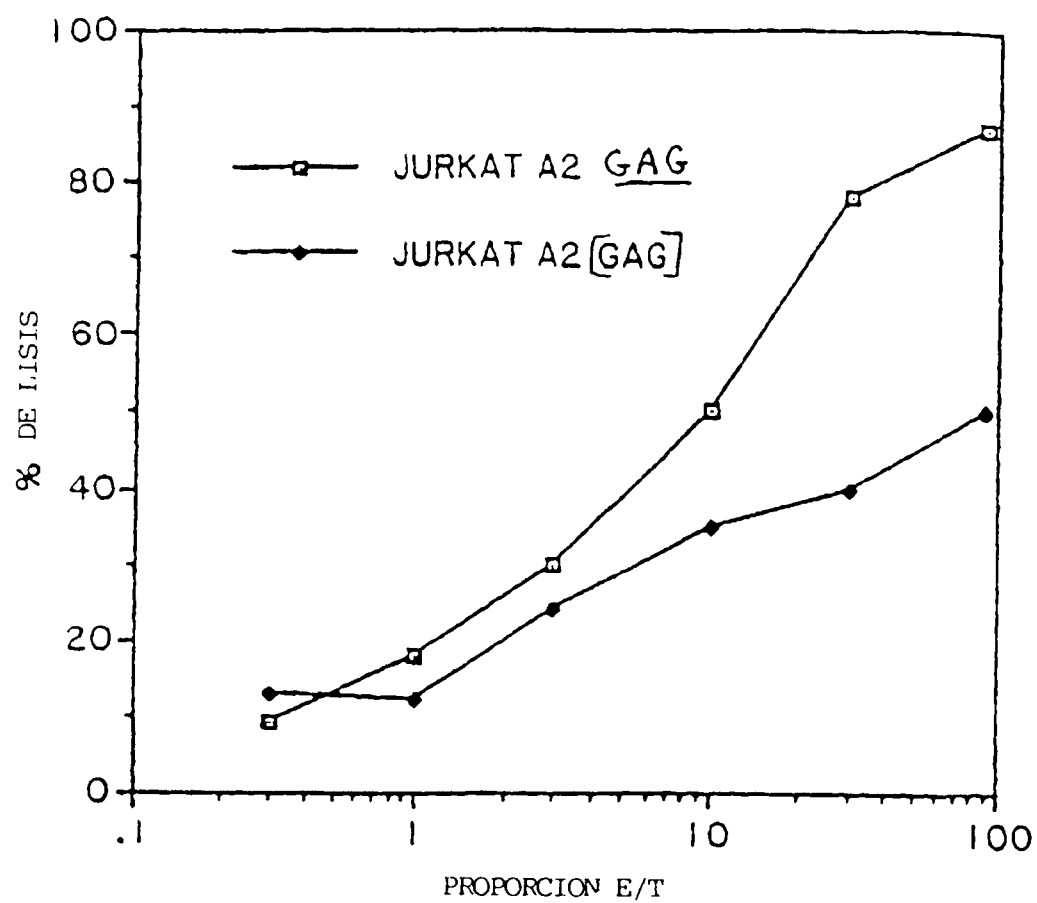


FIG.IIB

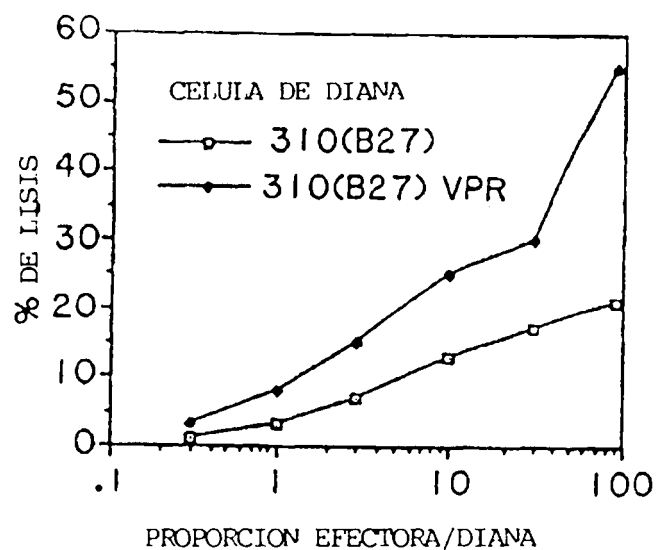


FIG.11C

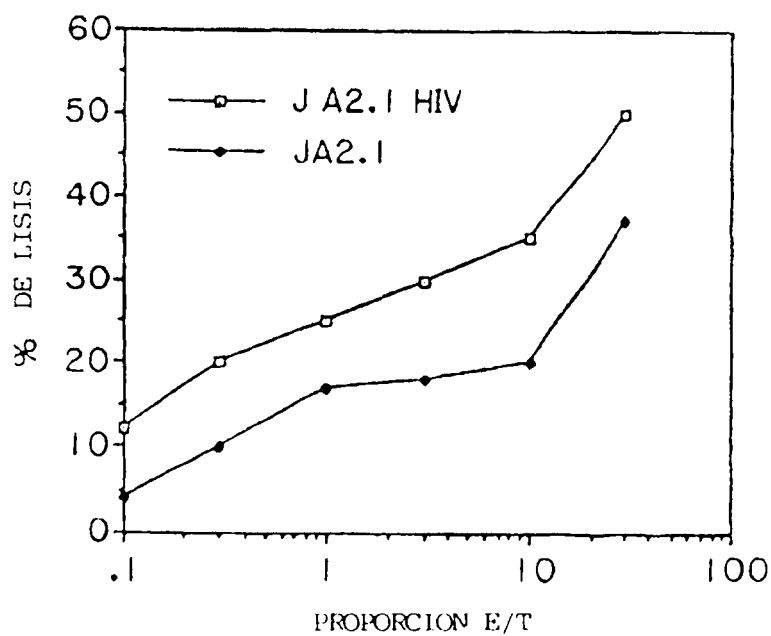


FIG.12

ES 2 272 611 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Peterson, Per A
Jackson, Michael
Lenglade-Demoyen, Pierre
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: ACTIVACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS T CITOTÓXICAS
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 36
- (iv) DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA
- 15 (A) DESTINATARIO: The Scripps Research Institute
(B) CALLE: 10666 North Torrey Pines Street
(C) CIUDAD: La Jolla
(D) ESTADO: California
20 (E) PAIS: Estados Unidos
(F) ZIP: 92037
- (v) FORMATO LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 25 (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
(B) ORDENADOR: Compatible con PC de IBM
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
30 (D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0, Versión #1.25
- (vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD:
- 35 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US93/
(B) FECHA DE REGISTRO: 18 de febrero de 1993
(C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) DATOS DE LA SOLICITUD PREVIA:
- 40 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 07/841.662
(B) FECHA DE REGISTRO: 19 de febrero de 1992
- (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
- 45 (A) NOMBRE: Logan, April
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 33.950
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: SEQ0002P
- (ix) INFORMACIÓN PARA TELECOMUNICACIÓN:
- 50 (A) TELÉFONO: (619) 554-2937
(B) TELEFAX: (619) 554-6312

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 1:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 23 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
60 (C) TIPO DE HEBRA: única
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- 65 (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO

ES 2 272 611 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 1:

CCACCATGGC CGTCATGGCG CCC

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 2:

GGTCACACTT TACAAGCTCT GAG

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 3:

CCACCATGCT GGTCATGGCG CCC

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 4:

GGACTCGATG TGAGAGACAC ATC

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 5:

ES 2 272 611 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 5:

CCACCATGCG GGTCATGGCG CCC

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 6:

GGTCAGGCTT TACAAGCGAT GAG

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 7:

CCACCATGCG GGTAGATGCC CTC

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 272 611 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 8:

GGTTACAAGC TGTGAGACTC AGA

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 9:

CCACCATGGC GCCCCGAAGC CTC

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 10:

GGTCACACTT TATTAGCTGT GAG

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 11:

ES 2 272 611 T3

CCACCATGGC GCCCCGAACC CTC

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 12:

GGTCACAATT TACAAGCCGA GAG

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 427 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 13:

40	AATTCGTTGC AGGACAGGAT GTGGTGCCCG ATGTGACTAG CTCTTTGCTG CAGGCCGTCC	60
	TATCCTCTGG TTCCGATAAG AGACCCAGAA CTCCGGCCCC CCACCGCCCA CCGCCACCCC	120
	CATACATATG TGGTACGCAA GTAAGAGTGC CTGCGCATGC CCCATGTGCC CCACCAAGAG	180
45	TTTTCATCC CATAAAGTC CCCAAAGTGG AGAACCGAAC CAATTCTTCG CGGGCAGAAC	240
	AAAAGCTTCT GCACACGTCT CCACTGCAAT TTGGAGCCGG CCGGCGTGTG CAAAAGAGGT	300
50	GAATCGAACG AAAGACCCGT GTGTAAAGCC GCGTTTCCAA AATGTATAAA ACCGAGAGCA	360
	TCTGGCCAAT GTGCATCAGT TGTGGTCAGC AGCAAAATCA AGTGAATCAT CTCAGTGCAA	420
	CTAAAGG	427

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 740 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

ES 2 272 611 T3

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 14:

5	ATTCGATGCA CACTCACATT CTTCTCCTAA TACGATAATA AAACCTTTCCA TGAAAAATAT	60
	GGAAAAATAT ATGAAAATTG AGAAATCCAA AAAACTGATA AACGCTCTAC TTAATTAAAA	120
	TAGATAAATG GGAGCGGCTG GAATGGCGGA GCATGACCAA GTTCCTGCGC CAATCAGTCG	180
10	TAAAACAGAA GTCGTGGAAG GCGGATAGAA AGAATGTTTCG ATTTGACGGG CAAGCATGTC	240
	TGCTATGTGG CGGATTGCGG AGGAATTGCA CTGGAGACCA GCAAGGTTCCT CATGACCAAG	300
	AATATAGCGG TGTGAGTGAG CGGGAAGCTC GGTTCCTGTC CAGATCGAAC TCAAACTAG	360
15	TCCAGCCAGT CGCTGTCGAA ACTAATTAAG TTAATGAGTT TTTCATGTTA GTTTCGCGCT	420
	GAGCAACAAT TAAGTTTATG TTTCAGTTTCG GCTTAGATTT CGCTGAAGGA CTTGCCACTT	480
	TCAATCAATA CTTTAGAACA AAATGAAAAC TCATTCTAAT AGCTTGGTGT TCATCTTTT	540
20	TTTTAATGAT AAGCATTTTG TCGTTTATAC TTTTATATT TCGATATTAA ACCACCTATG	600
	AAGTTCATTT TAATCGCCAG ATAAGCAATA TATTGTGTAA ATATTTGTAT TCTTTATCAG	660
25	GAAATTCAGG GAGACGGGGA AGTTACTATC TACTAAAAGC CAAACAATTT CTTACAGTTT	720
	TACTCTCTCT ACTCTAGAGT	740

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 15:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 60 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE HEBRA: único
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- 40 (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- 45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 15:

GCTTGGATCC AGATCTACCA TGTCTCGCTC CGTGGCCTTA GCTGTGCTCG CGCTACTCTC 60

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 16:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 36 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE HEBRA: único
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- 65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 16:

GGATCCGGAT GGTTACATGT CGCGATCCCA CTTAAC

36

ES 2 272 611 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 17:

GGAGCCGTGA CTGACTGAG

19

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 18:

CCCTCGGCAC TGACTGACTC CTAG

24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 19:

GCGGATCCAT GGCCGTCATG GCGCCC

26

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 29 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: único

ES 2 272 611 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 20:

CGGAATTCTC ATCAGGGCTT CGGCAGCCC

29

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 38 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 21:

GGATCCTCTC AGACGCCGAG ATGCGGGTCA CGGCGCCC

38

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 52 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 22:

AGCTTGAGCA CTTGTTCTTT TTGCAGAAGC TCAGAATAAA CGCTCAACTT

50

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

ES 2 272 611 T3

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 23:

5		Glu	Gln	Leu	Glu	Ser	Ile	Ile	Asn	Phe	Glu
		1				5					10
		Lys	Leu	Thr	Glu	Trp	Thr	Ser	Ser	Asn	Val
10		11				15					20
		Met	Glu	Glu	Arg						
		21									

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

25

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

30

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 24:

35

Asp	Leu	Arg	Gly	Tyr	Val	Tyr	Gln	Gly	Leu
1				5					10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 25:

40

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

45

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

50

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

55

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 25:

Ala	Ser	Asn	Glu	Asn	Met	Glu	Thr	Met
1				5				

60

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

65

(A) LONGITUD: 14 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

ES 2 272 611 T3

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 26:

Ser Glu Arg Pro Gln Ala Ser Gly Val Tyr

1 5 10

Met Gly Asn Leu

11

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 14 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 27:

Asp Ser Ser Gly Val Glu Asn Pro Gly Gly

1 5 10

Tyr Cys Thr Lys

11

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 28:

ES 2 272 611 T3

Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln
1 5

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

10 (B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

20 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 29:

Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn
1 5

25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

40 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 30:

Phe Arg Ile Gly Cys Arg His Ser Arg
1 5

45

50 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

55 (B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

65 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 31:

ES 2 272 611 T3

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 32:

Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu The Val
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 33:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 14 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 33:

Leu Pro Asp Cys Lys Val Met Val His Asp
1 5 10

Pro Ser Leu Ala
11

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

ES 2 272 611 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 34:

ATATGGATCC TCACCATCTC AGGGTGAGGG GC

32

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

20

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 35:

25

Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu Lys Ser
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 36:

30

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

35

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

40

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

45

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 36:

Phe Ala Pro Gly Asn Tyr Pro Ala Leu
1 5

50

LISTADO DE SECUENCIAS

55

<110> The Scripps Research Institute

<120> Activación *in vitro* de células T citotóxicas

60

<130> SJK/FP6048722

<140> EP 02014141.2

<141> 2002-06-25

65

<150> EP 93906141.2

<151> 1993-02-18

ES 2 272 611 T3

<150> US 7/841,662

<151> 1992-02-19

5 <160> 45

<170> PatentIn Ver. 2.1

10 <210> 1

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN

20 <400> 1

ccaccatggc cgtcatggcg ccc

23

25 <210> 2

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN

35 <400> 2

ggtcacactt tacaagctct gag

23

40 <210> 3

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN

50 <400> 3

ccaccatgct ggtcatggcg ccc

23

55 <210> 4

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

60

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN

65 <400> 4

ggactegatg tgagagacac atc

23

ES 2 272 611 T3

	<210> 5	
	<211> 23	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN	
10	<400> 5	
	ccaccatgcg ggcatggcg ccc	23
15	<210> 6	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN	
25	<400> 6	
	ggtcaggctt tacaagcgat gag	23
30	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN	
40	<400> 7	
	ccaccatgcg ggtagatgcc ctcc	24
45	<210> 8	
	<211> 23	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN	
55	<400> 8	
	ggttacaagc tgtgagactc aga	23
60	<210> 9	
	<211> 23	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 272 611 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN	
5	<400> 9	
	ccaccatggc gccccgaagc ctc	23
10	<210> 10	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN	
20	<400> 10	
	ggtcacactt tattagctgt gaga	24
25	<210> 11	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN	
35	<400> 11	
	ccaccatggc gccccgaacc ctc	23
40	<210> 12	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN	
50	<400> 12	
	ggtcacaatt tacaagccga gag	23
55	<210> 13	
	<211> 427	
	<212> ADN	
60	<213> <i>Drosophila melanogaster</i>	
65		

ES 2 272 611 T3

<400> 13

	AATTCGTTGC AGGACAGGAT GTGGTGCCCG ATGTGACTAG CTCTTTGCTG CAGGCGCTCC	60
5	TATCCTCTGG TTCCGATAAG AGACCCAGAA CTCGCGCCCC CCACCGCCCA CCGCCACCCC	120
	CATACATATG TGGTACGCAA GTAAGAGTGC CTGCGCATGC CCCATGTGCC CCACCAAGAG	180
	TTTTGCATCC CATACAAGTC CCCAAAGTGG AGAACCGAAC CAATTCTTCG CGGGCAGAAC	240
10	AAAAGCTTCT GCACACGTCT CCACTGGAAT TTGGAGCCGG CCGGCGTGTG CAAAAGAGGT	300
	GAATCGAACG AAAGACCCGT GTGTAAAGCC GCGTTTCCAA AATGTATAAA ACCGAGAGCA	360
	TCTGGCCAAT GTGCATCAGT TGTGGTCAGC AGCAAAATCA AGTGAATCAT CTCAGTGCAA	420
15	CTAAAGG	427

<210> 14

<211> 740

20 <212> ADN

<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 14

25	ATTTCGATGCA CACTCACATT CTCTCCTAA TACGATAATA AAACCTTCCA TGAAAAATAT	60
	CGAAAAATAT ATGAAAATTG AGAAATCCAA AAAACTGATA AACGCTCTAC TTAATTAAAA	120
30	TAGATAAATG GGAGCGGCTG GAATGGCGGA GCATGACCAA GTTCCTGCGC CAATCAGTCG	180
	TAAAACAGAA GTCGTGGAAA GCGGATAGAA AGAATGTTCT ATTTGACGGG CAAGCATGTC	240
	TGCTATGTGG CGGATTGCGG AGGAATTGCA CTGGAGACCA GCAAGGTTCT CATGACCAAG	300
35	AATATAGCGG TGTGAGTGAG CGGGAAGCTC GGTTTCTGTC CAGATCGAAC TCAAACTAG	360
	TCCAGCCAGT CGCTGTCGAA ACTAATTAAG TTAATGACTT TTTCATGTTA GTTTCGCGCT	420
	GAGCAACAAT TAAGTTTATG TTTCAGTTCT GCTTAGATTT CGCTGAAGGA CTTGCCACTT	480
40	TCAATCAATA CTTTAGAACA AAATGAAAAC TCATTCTAAT AGCTTGGTGT TCATCTTTT	540
	TTTTAATGAT AAGCATTTTG TCGTTTATAC TTTTATATTT TCGATATTAA ACCACCTATG	600
45	AAGTTCATTT TAATCGCCAG ATAAGCAATA TATTGTGTAA ATATTTGTAT TCTTTATCAG	660
	GAAATTCAGG GAGACGGGGA AGTTACTATC TACTAAAAGC CAAACAATTT CTTACAGTTT	720
	TACTCTCTCT ACTCTAGAGT	740

50 <210> 15

<211> 60

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN

60 <400> 15

gcttgatcc agatctacca tgtctgctc cgtggcctta gctgtgctcg cgtactctc

60

65 <210> 16

<211> 36

ES 2 272 611 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN	
	<400> 16	
10	ggatccggat ggttacatgt cgcgatccca cttaac	36
	<210> 17	
15	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN	
	<400> 17	
25	ggagccgtga ctgactgag	19
	<210> 18	
30	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN	
	<400> 18	
40	ccctcggcac tgactgactc ctag	24
	<210> 19	
45	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN	
	<400> 19	
55	gcggatccat ggccgtcatg gcgccc	26
	<210> 20	
60	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN	

ES 2 272 611 T3

<400> 20

cggaattctc atcagggctt cggcagccc 29

5 <210> 21
 <211> 38
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cADN de HLA B27 sol

15 <400> 21

ggatcctctc agacgccgag atgcgggtca cggcgccc 38

20 <210> 22
 <211> 52
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN

30 <400> 22

agcttgagca cttgtcttt ttgcagaagc tcagaataaa cgtcaactt tg 52

35 <210> 23
 <211> 24
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

45 <400> 23

	Glu	Gln	Leu	Glu	Ser	Ile	Ile	Asn	Phe	Glu
50	1				5					10
	Lys	Leu	Thr	Glu	Trp	Thr	Ser	Ser	Asn	Val
	11				15					20
55	Met	Glu	Glu	Arg						
	21									

<210> 24
 60 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

ES 2 272 611 T3

<400> 24

Asp Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
1 5 10

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 25

Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met
1 5

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 26

Ser Glu Arg Pro Gln Ala Ser Gly Val Tyr Met Gly Asn Leu
1 5 10

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 27

Asp Ser Ser Gly Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Cys Thr Lys
1 5 10

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

ES 2 272 611 T3

<400> 28
 Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln
 1 5
 5
 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <400> 29
 Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn
 1 5
 20
 <210> 30
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <400> 30
 Phe Arg Ile Gly Cys Arg His Ser Arg
 1 5
 35
 <210> 31
 40 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <400> 31
 50 Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val
 1 5
 55 <210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 65

ES 2 272 611 T3

<400> 32

Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu The Val
1 5 10

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 33

Leu Pro Asp Cys Lys Val Met Val His Asp Pro Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 34

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de ADN

<400> 34

atatggatcc tcaccatctc agggtagagg gc

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 35

Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu Lys Ser
1 5 10

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 36

Phe Ala Pro Gly Asn Tyr Pro Ala Leu
1 5

32

ES 2 272 611 T3

<210> 37
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 10
 <400> 37

 Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
 1 5
 15

 <210> 38
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

 <400> 38

 Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
 1 5
 30

 <210> 39
 35 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

 <400> 39

 Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
 1 5 10
 45

 <210> 40
 50 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

 <400> 40
 60
 Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr
 1 5

 65 <210> 41
 <211> 10

ES 2 272 611 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 41

10 Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu
1 5 10

<210> 42

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

25 <400> 42

Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
1 5

30 <210> 43

<211> 8

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

40

<400> 43

Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
1 5

45

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

55 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 44

60 Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
1 5

<210> 45

<211> 8

65 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 272 611 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

5 <400> 45

Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met
1 5

10

LISTADO DE SECUENCIAS

15

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: Peterson, Per A
Jackson, Michael
20 Lenglade-Demoyen, Pierre

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: ACTIVACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS T CITOTÓXICAS

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 36

25

(iv) DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA

(A) DESTINATARIO: The Scripps Research Institute

(B) CALLE: 10666 North Torrey Pines Street

30

(C) CIUDAD: La Jolla

(D) ESTADO: California

(E) PAIS: Estados Unidos

35

(F) ZIP: 92037

(v) FORMATO LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Disquete

(B) ORDENADOR: Compatible con PC de IBM

40

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0, Versión #1.25

(vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD:

45

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US93/

(B) FECHA DE REGISTRO: 18 de febrero de 1993

(C) CLASIFICACIÓN:

50

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD PREVIA:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: 07/841.662

(B) FECHA DE REGISTRO: 19 de febrero de 1992

55

(viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:

(A) NOMBRE: Logan, April

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 33.950

60

(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: SEQ0002P

(ix) INFORMACIÓN PARA TELECOMUNICACIÓN:

(A) TELÉFONO: (619) 554-2937

65

(B) TELEFAX: (619) 554-6312

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 1:

ES 2 272 611 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 1:

CCACCATGGC CGTCATGGCG CCC

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 2:

GGTCACACTT TACAAGCTCT GAG

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 3:

CCACCATGCT GGTCATGGCG CCC

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 272 611 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 4:

GGACTCGATG TGAGAGACAC ATC

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 5:

CCACCATGCG GGTCATGGCG CCC

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 6:

GGTCAGGCTT TACAAGCGAT GAG

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 7:

ES 2 272 611 T3

CCACCATGCG GGTAGATGCC CTC

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 8:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 23 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 10 (C) TIPO DE HEBRA: única
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- 15 (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 8:

20 GGTTACAAGC TGTGAGACTC AGA

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 9:

- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 23 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 30 (C) TIPO DE HEBRA: única
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- 35 (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 9:

40 CCACCATGGC GCCCCGAAGC CTC

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 10:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 23 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 50 (C) TIPO DE HEBRA: única
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- 55 (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 10:

60 GGTCACACTT TATTAGCTGT GAG

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 11:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 23 pares de bases

ES 2 272 611 T3

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 11:

CCACCATGGC GCCCCGAACC CTC

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 12:

GGTCACAATT TACAAGCCGA GAG

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 427 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 13:

55	AATTCGTTCG AGGACAGGAT GTGGTGCCCC ATGTGACTAG CTCCTTGCTG CAGGCCGTCC	60
	TATCCTCTGG TTCCGATAAG AGACCCAGAA CTCGGGCCCC CCACCGCCCA CCGCCACCCC	120
	CATACATATG TGGTACGCAA GTAAGAGTGC CTGCGCATGC CCCATGTGCC CCACCAAGAG	180
	TTTTGCATCC CATAAAGTC CCCAAAGTGG AGAACCGAAC CAATTCTTCG CGGGCAGAAC	240
60	AAAAGCTTCT GCACACGTCT CCACTGGAA7 TTGGAGCCGG CCGGCGTGTG CAAAAGAGGT	300
	GAATCGAACG AAAGACCCGT GTGTAAAGCC GCGTTTCCAA AATGTATAAA ACCGAGAGCA	360
	TCTGGCCAAT GTGCATCAGT TGTGGTCAGC AGCAAAATCA AGTGAATCAT CTCAGTGCAA	420
65	CTAAAGG	427

ES 2 272 611 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 740 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE HEBRA: doble
 10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

15 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 14:

20	ATTTCGATGCA CACTCACATT CTTCTCCTAA TACGATAATA AAACCTTTCCA TGAAAAATAT	60
25	GGAAAAATAT ATGAAAAATTG AGAAATCCAA AAAACTGATA AACGCTCTAC TTAATTAAAA	120
30	TAGATAAATG GGAGCGGCTG GAATGGCGGA GCATGACCAA GTTCCTGCGC CAATCAGTGG	180
35	TAAAACAGAA GTCGTGGAAA GCGGATAGAA AGAATGTTTCG ATTTGACGGG CAAGCATGTC	240
40	TGCTATGTGG CGGATTGCGG AGGAATTGCA CTGGAGACCA GCAAGGTTCT CATGACCAAG	300
45	AATATAGCGG TGTGAGTGAG CGGGAAGCTC GGTTCCTGTC CAGATCGAAC TCAAAACTAG	360
50	TCCAGCCAGT CGCTGTCGAA ACTAATTAAG TTAATGAGTT TTTCATGTTA GTTTCGCGCT	420
55	GAGCAACAAT TAAGTTTATG TTTTCAGTTCG GCTTAGATTT CGCTGAAGGA CTTGCCACTT	480
60	TCAATCAATA CTTTAGAACA AAATGAAAAC TCATTCTAAT AGCTTGGTGT TCATCTTTTT	540
65	TTTTAATGAT AAGCATTTTG TCGTTTATAC TTTTATATT TCGATATTAA ACCACCTATG	600
70	AAGTTCATTT TAATCGCCAG ATAAGCAATA TATTGTGTAA ATATTTGTAT TCTTTATCAG	660
75	GAAATTCAGG GAGACGGGGA AGTTACTATC TACTAAAAGC CAAACAATTT CTTACAGTTT	720
80	TACTCTCTCT ACTCTAGAGT	740

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 60 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE HEBRA: único
 50 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

55 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 15:

60	GCTTGGATCC AGATCTACCA TGTCTCGCTC CGTGGCCTTA GCTGTGCTCG CGCTACTCTC	60
----	---	----

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 65 (A) LONGITUD: 36 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 272 611 T3

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 16:

GGATCCGGAT GGTACATGT CGCGATCCCA CTTAAC

36

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 17:

GGAGCCGTGA CTGACTGAG

19

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 18:

CCCTCGGCAC TGA CTGACTGACTC CTAG

24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

ES 2 272 611 T3

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 19:

5 GCGGATCCAT GGCCGTCATG GCGCCC 26

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 20:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 29 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

20 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 20:

25 CGGAATTCTC ATCAGGGCTT CGGCAGCCC 29

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 21:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 38 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

35 (C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

40 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 21:

45 GGATCCTCTC AGACGCCGAG ATGCGGGTCA CGGCGCCC 38

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 22:

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 52 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

55 (C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

60 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 22:

65 AGCTTGAGCA CTTGTTCTTT TTGCAGAAGC TCAGAATAAA CGCTCAACTT 52

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 23:

ES 2 272 611 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 23:

20	Glu	Gln	Leu	Glu	Ser	Ile	Ile	Asn	Phe	Glu
	1				5					10
	Lys	Leu	Thr	Glu	Trp	Thr	Ser	Ser	Asn	Val
	11				15					20
25	Met	Glu	Glu	Arg						
	21									

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 10 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 24:

50	Asp	Leu	Arg	Gly	Tyr	Val	Tyr	Gln	Gly	Leu
	1				5					10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

ES 2 272 611 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 25:

Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 14 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 26:

Ser Glu Arg Pro Gln Ala Ser Gly Val Tyr
1 5 10

Met Gly Asn Leu
11

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 14 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 27:

Asp Ser Ser Gly Val Glu Asn Pro Gly Gly
1 5 10

Tyr Cys Thr Lys
11

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

ES 2 272 611 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 28:

Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 29:

Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 30:

Phe Arg Ile Gly Cys Arg His Ser Arg
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

ES 2 272 611 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

5 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 31:

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val
1 5

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

20 (B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

30 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 32:

35 Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu The Val
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 33:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 14 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

45 (C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

50 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 33:

Leu Pro Asp Cys Lys Val Met Val His Asp
1 5 10

60 Pro Ser Leu Ala

11

65 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N° 34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 272 611 T3

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 34:

ATATGGATCC TCACCATCTC AGGGTGAGGG GC

32

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 35:

Arg	Gly	Tyr	Val	Tyr	Gln	Gly	Leu	Lys	Ser
1				5					10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº 36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 36:

Phe	Ala	Pro	Gly	Asn	Tyr	Pro	Ala	Leu
1				5				