



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 301 668**

51 Int. Cl.:
G06F 19/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02761917 .0**
86 Fecha de presentación : **28.03.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1393236**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.2004**

54 Título: **Procedimiento de análisis de los linfocitos T por medio de los receptores de los linfocitos T de un organismo.**

30 Prioridad: **13.04.2001 US 283378 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2008

73 Titular/es: **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS)**

72 Inventor/es: **Soulillou, Jean-Paul;
Delsuc, Marc-André;
Guillet, Marina y
Brouard, Sophie**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de análisis de los linfocitos T por medio de los receptores de los linfocitos T de un organismo.

5 La invención se refiere al estudio del sistema inmunitario de los organismos tales como el ser humano o los animales, en particular al análisis de los linfocitos T activados o no de un organismo mediante el estudio de su receptor.

10 Las respuestas inmunitarias se pueden clasificar en dos grandes categorías: las respuestas naturales y las respuestas adaptativas (o específicas). Las células implicadas en la respuesta natural usan unos sistemas de reconocimiento primitivos y no específicos. Este tipo de respuesta representa por lo tanto la primera línea de defensa contra las infecciones, y predomina en los estados iniciales de la infección. En el caso en el que la inmunidad natural es ineficaz, se utiliza la inmunidad adaptativa, que usa unas respuestas específicas adaptadas a cada microorganismo. Los linfocitos están en el origen de este reconocimiento adaptativo.

15 Existen dos tipos de linfocitos: los linfocitos B, responsables de la inmunidad humoral (producción de anticuerpos) y los linfocitos T, responsables de la inmunidad celular. Estos últimos desempeñan una función central en biología. Reconocen unos péptidos que proceden de la degradación intracelular de antígenos, pero sólo cuando estos péptidos están asociados con unas moléculas portadas por las células presentadoras de antígeno denominadas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad o CMH (asimismo denominado Human Leucocyte Antigen o HLA), portadas por las células presentadoras de antígeno. Para esta función, los linfocitos T usan un receptor específico denominado receptor de antígeno de los linfocitos T o TCR.

20 El receptor de las células T (TCR) es un heterodímero constituido por dos cadenas: α y β . Los inventores se interesarán en la presente memoria únicamente en la cadena β que comprende los genes $V\beta$ (24 en el ser humano), $D\beta$ (2 en el ser humano), $J\beta$ (12 en el ser humano) y $C\beta$ (2 en el ser humano), inicialmente separados sobre el ADN. Uno de los genes $V\beta$ se une de manera aleatoria con uno de los genes $D\beta$, $J\beta$ y $C\beta$ para formar un receptor funcional. Así, un gran número de TCR diferentes se puede generar teóricamente (aproximadamente $25 \cdot 10^6$ TCR diferentes). El encuentro de un antígeno conlleva la selección de linfocitos T que portan un TCR específico constituido por un conjunto $V\beta$ - $D\beta$ - $J\beta$ particular. El reconocimiento del antígeno se realiza principalmente a nivel de la región hipervariable CDR3 (Complementary Determining Region 3) que se forma mediante la reestructuración de los genes $V\beta$, $D\beta$ y $J\beta$ y que es de longitud variable. Normalmente, en un individuo sano, los transcritos que codifican para una familia $V\beta$ cualquiera usan todos las longitudes posibles de la CDR3.

35 Hasta ahora, el análisis del receptor de las células T se ha realizado principalmente de manera "cualitativa" (es decir: búsqueda de una eventual selección) gracias a unos procedimientos tales como los usados por el programa conocido con la marca Immunoscope® y que estudia este receptor a nivel de la distribución de las longitudes de la región CDR3, región que sería la más implicada en el reconocimiento del péptido.

40 Después de la amplificación de esta región CDR3, de la longitud variable, gracias a un cebador $C\beta$ y a un cebador $V\beta$, el programa Immunoscope suministra los resultados en forma de picos, estando cada perfil constituido por 7 a 11 picos, es decir de 7 a 11 tamaños diferentes de la CDR3, separados cada uno por 3 nucleótidos. Así, cuando todas las longitudes de la CDR3 están representadas en una familia $V\beta$ dada, se observa un perfil gaussiano, característico de una respuesta policlonal. Es, por ejemplo, lo que se observa, generalmente, en un individuo sano. A la inversa, una longitud de la CDR3 puede estar mayoritariamente representada tras una activación particular que ha seleccionado unos clones de linfocitos T particulares, y se observa entonces una "alteración" oligo- o monoclonal de la distribución de las longitudes de la región CDR3, perdiendo entonces los perfiles su carácter gaussiano.

50 Un medio de comparar el perfil de una muestra frente al perfil de control es usar el cálculo descrito en el artículo de G. Gorochov (Nat. Med., 1998, 4(2):215) que calcula la diferencia entre el espacio debajo de cada pico del perfil de control y el espacio debajo de cada pico del perfil de la muestra. Así, se obtienen unos porcentajes de alteración con relación al gaussiano, y los resultados se representan en forma de estructuras tridimensionales que permiten visualizar las alteraciones asociadas con todas las familias $V\beta$ de una muestra dada en una misma gráfica. Estas gráficas, habitualmente denominadas Reperturb, aparecen planas cuando el repertorio no está alterado, y perturbadas cuando el repertorio está alterado.

55 A pesar de su interés, estos métodos de análisis cualitativo del receptor de las células T no permiten tener un conocimiento preciso de la cantidad de ARNm $V\beta$ afectado por un proceso de selección (y, por lo tanto, indirectamente de la importancia del grupo de células T que usan una reestructuración $V\beta$ dada) y presentan por lo tanto un límite importante siendo incapaces de jerarquizar las anomalías observadas.

60 A título de ejemplo, la figura 2 representa un perfil gaussiano, y la figura 1 representa una expansión monoclonal obtenidas mediante Immunoscope®. Usando el método Reperturb, aparecen en la figura 3 cuatro picos que corresponden cada uno a una familia $V\beta$ que presenta una expansión clonal. A pesar de su interés, este análisis cualitativo solo no permite saber si las TCR que presentan estas expansiones interesan a una fracción importante del transcriptoma $V\beta$, o si sólo representan una minoría entre el grupo de células T. Por ejemplo, en la figura 3, no se sabe si las células T que portan una de las 4 expansiones clonales están más representadas que otras entre la población de células T totales, y están, por lo tanto, más particularmente implicadas en la reacción inmunitaria estudiada. A la inversa, la gráfica

permanece plana cuando todas las familias $V\beta$ presentan una distribución gaussiana de las longitudes de la CDR3 como se muestra en la figura 4. Este perfil plano se puede deber:

- a una ausencia de respuesta (no está implicado ningún linfocito T)
- a una respuesta policlonal debida a la activación de un gran número de clones T, enmascarando esta activación la presencia de expansiones clonales potenciales, o
- a la activación de células T sin ninguna modificación de la distribución de longitud de la CDR3. Es el caso, por ejemplo, de un perfil observado después de la estimulación mediante unos ligandos policlonales (anticuerpo anti-CD3, Concanavalina A, PHA, etc.) o mediante unos superantígenos.

El análisis cualitativo solo no permite diferenciar entre estas tres hipótesis.

El solicitante ha sido el primero en usar el método Immunoscope® para estudiar el rechazo y la tolerancia de aloinjertos o, más recientemente, de xenoinjertos. Sin embargo, aunque estos estudios han sido realizados en líneas de ratas congénicas (una combinación mucho más “simplificada” que la combinación alogénica), han revelado unas alteraciones de tipo privado (específicas de un individuo) para la mayoría, mientras que las alteraciones públicas (misma longitud y misma secuencia de la CDR3 encontrada en varios animales) son unos eventos extremadamente raros. Debido a este perfil privado dominante (y por lo tanto aparentemente caótico) y de la fuerte reactividad cruzada del TCR, no se puede obtener ninguna información reproducible sobre la fisiología del alorreconocimiento. Partiendo de estas observaciones y de este hecho, parece que un análisis combinado de las alteraciones cualitativas (privadas/públicas) y de la estimación cuantitativa del grupo de células T que intervienen en estas alteraciones (número de transcritos $V\beta$ para cada perfil alterado) es el único medio de acercarse a la cinética de la respuesta de los linfocitos T.

Así, la capacidad de evaluación y de estudio de la dinámica y de la importancia de la respuesta de los linfocitos T *in vivo* de los inventores es muy limitada. El análisis del repertorio de TCR es un reflejo indirecto del estado de la movilización y de la activación de las células T en una situación biológica dada. Sin embargo, la importante reactividad cruzada del TCR, así como la gran diversidad de los péptidos afectados, hace difícil el uso de las alteraciones cualitativas del repertorio $V\beta$ considerado aisladamente (por ejemplo según el método Immunoscope) como marcador para identificar y jerarquizar de manera precisa la población de células T implicada en una reacción inmunitaria compleja, incluso si el estudio del repertorio se realiza a nivel de las secuencias y de las variaciones de longitud de la región CDR3. A pesar de su interés, los métodos conocidos previamente de análisis del TCR no permitían por lo tanto tener un conocimiento preciso del grupo de ARNm de linfocitos T (con relación al transcriptoma $C\beta$ global), usando una reestructuración de las cadenas $V\beta$ dadas. Además, la acumulación de los transcritos $V\beta$ es un parámetro diferente de la expresión de las proteínas correspondientes en la superficie de las células T porque éstas pueden ser subreguladas después de la interacción con el antígeno.

Uno de los objetivos de la invención es proporcionar un nuevo método de análisis que permita añadir una dimensión cuantitativa, parámetro esencial para el análisis de las alteraciones del repertorio.

Con vistas a la realización de este objetivo, el solicitante propone, según la invención, un procedimiento de análisis de los receptores de los linfocitos T de un organismo, que comprenden las etapas que consisten en:

- determinar el número de transcritos para cada gen $V\beta$, para obtener unos primeros datos. Después, este número de transcritos se puede representar, por ejemplo, en forma de valores brutos (número de transcritos para cada familia $V\beta$), en forma de proporción entre este número de transcritos y el número de transcritos de un gen de referencia, por ejemplo el gen HPRT (Hipoxantina fosforibosilo transferasa), siendo éste un gen presente en todas las células y que permite uniformizar los datos, en forma de porcentaje de cada transcrito $V\beta$ entre la suma de los transcritos $V\beta$ o en forma de una medición de la variación entre el número de transcritos en una familia $V\beta$ dada de una muestra dada y el número de transcritos de la misma familia $V\beta$ de una muestra de referencia.
- amplificar la región CDR3 de los receptores de los linfocitos T para cada uno de los genes $V\beta$ asociados al organismo,
- separar las diferentes longitudes de la CDR3 de los receptores de los linfocitos T para cada uno de los genes $V\beta$ asociado al organismo, y estimar la proporción de los transcritos de cada longitud de la CDR3 en cada familia $V\beta$ para obtener unos segundos datos,
- representar en un diagrama de cuatro variables los primeros y segundos datos en función de los genes $V\beta$ y de la longitud de las regiones CDR3.

Así, la invención permite seguir precisamente la existencia y la jerarquía cuantitativa de anomalías de la distribución de las longitudes de la región CDR3 durante la iniciación, la cinética, la expansión, la memoria y el grado de propagación de epítipo en una situación de respuesta inmune compleja (por ejemplo un contexto patológico), debido al hecho de que los dos parámetros (perfil de alteración de la distribución de las longitudes de la región CDR3 del TCR

ES 2 301 668 T3

con relación a la situación de reposo y evaluación cuantitativa de los transcritos $V\beta$ del grupo de células T implicadas) pueden ser globalmente visualizados, de manera simultánea, en el diagrama.

La invención ofrece por lo tanto una vista integrada de las alteraciones del TCR, en lugar de sólo la descripción individual de las alteraciones de cada familia $V\beta$. Es más propicia a la comprensión de los eventos inmunológicos fundamentales y aplicados que implican una respuesta linfocitaria T (enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes, cánceres, injertos, etc.). La presentación de los resultados es asimismo completa, didáctica y fácil de comprender.

La invención propone una nueva estrategia de evaluación de la respuesta inmune *in vivo*, preferentemente fundada sobre una integración asistida por ordenador de las alteraciones del transcriptoma $V\beta$ de los linfocitos $T\alpha\beta$ activados.

El procedimiento de la invención combina el análisis obtenido por ejemplo mediante los programas Reperturb e Immunoscope® de la alteración de la longitud de la CDR3 (en una familia $V\beta$ dada), comparada con el perfil gaussiano en reposo, con una medición cuantitativa de cada transcrito $V\beta$ mediante PCR cuantitativa (por ejemplo siguiendo el método conocido con el nombre de TaqMan) de cada familia $V\beta$ y, por lo tanto, de los transcritos para todas las señales TCR alteradas. Se usa un análisis factorial para definir las coherencias de uso de los $V\beta$ y de su alteración. La invención incluye un programa de expresión gráfica que permite una vista general y, por ejemplo tridimensional, de la jerarquía de las alteraciones y, por lo tanto, del estado de activación de las células T reactivas.

El procedimiento según la invención podrá presentar además al menos una cualquiera de las características siguientes:

- al menos una de las variables se representa sin estar asociada a una dimensión del espacio;
- al menos una de las variables se representa mediante diferencias de aspecto local del diagrama;
- las diferencias de aspecto local son unas diferencias de color;
- la variable que no está asociada a una dimensión del espacio corresponde a los segundos datos;
- los primeros datos se representan según la dirección vertical;
- los valores predeterminados corresponden, para cada gen $V\beta$, a una repartición gaussiana de las proporciones de transcritos que corresponden a las regiones CDR3 asociadas a este gen;
- comprende, después de la determinación de los primeros y de los segundos datos, las etapas que consisten en elegir un gen $V\beta$ en función de los resultados de las dos primeras etapas, y en extraer de la población de células T total las células T que portan un TCR constituido por esta familia $V\beta$ previamente elegida; y
- al menos ciertas de las etapas se realizan de manera automatizada.

Se prevé un programa informático para el análisis de los receptores de los linfocitos T de un organismo, apropiado para mandar la realización de al menos la etapa de representación del procedimiento según la invención.

Se prevé además, según la invención, una instalación de análisis de los receptores de los linfocitos T de un organismo, que comprende:

- unos medios automatizados para medir las cantidades de cada gen $V\beta$ y, eventualmente, la relación de estas cantidades con unos valores predeterminados para obtener unos primeros datos;
- unos medios automatizados para amplificar la región CDR3 para cada uno de los genes $V\beta$ de los receptores de los linfocitos T asociados con el organismo, y para medir, para cada gen $V\beta$, la cantidad relativa de cada región CDR3 con relación a la totalidad de las regiones CDR3 asociadas con un gen $V\beta$ para obtener unos segundos datos; y
- unos medios automatizados para representar en un diagrama de cuatro variables los primeros y los segundos datos en función de los genes $V\beta$ y de la longitud de las regiones CDR3. Este diagrama permite una visión simplificada y global del proceso complejo de movilización de las células T durante una reacción inmunitaria.

Se prevé un soporte de información que presenta un diagrama de análisis de los receptores de los linfocitos T de un organismo, que comprende las cuatro variables siguientes:

- los genes $V\beta$ asociados al organismo;
- la longitud de las regiones CDR3 de los receptores de los linfocitos T;

ES 2 301 668 T3

- unos primeros valores que representan la cantidad de transcritos de cada gen $V\beta$ en forma de cantidad relativa o absoluta;
- unos segundos datos que representan para cada una de las longitudes de la región CDR3 en cada gen $V\beta$ la diferencia entre la proporción de los transcritos que corresponden a una región CDR3 de un gen $V\beta$ en una muestra dada con relación a los transcritos que corresponden a la misma región CDR3 del mismo gen $V\beta$ de una muestra de referencia que es una muestra que presenta una distribución gaussiana de las longitudes de la CDR3.

La invención puede ser objeto de numerosas aplicaciones, por ejemplo en los sectores inmunológicos siguientes:

- seguimiento de la evolución de diferentes patologías a lo largo del tiempo tales como los cánceres, las enfermedades víricas (SIDA, infección con EBV, etc.), las enfermedades autoinmunes, etc.;
- seguimiento del efecto de diferentes tratamientos (inmunoterapia, etc.);
- estudio de los mecanismos de la respuesta inmunitaria en diferentes enfermedades y/o seguimiento de diferentes terapias;
- estudio de los mecanismos de rechazo y de tolerancia en el trasplante;
- diagnóstico de un “estado memoria”;

A continuación se proponen más precisamente algunos ejemplos de aplicaciones:

- seguimiento de la evolución de la enfermedad e investigación de una eventual correlación entre la regresión o la agravación de la enfermedad, y la importancia de la propagación, que corresponde al hecho de que la selección de los clones T evolucionará a lo largo del tiempo debido al reconocimiento de nuevas estructuras antigénicas mediante mimetismo molecular;
- seguimiento de la evolución, en el tiempo, del repertorio de las células T en unos pacientes que presentan, o no, una regresión continua de la enfermedad después de la inmunoterapia. La invención permitirá al mismo tiempo seguir el efecto de la terapia y el desarrollo de la respuesta inmune contra la enfermedad;
- detección de marcadores específicos relacionados con la evolución de la enfermedad. Por ejemplo, un aumento de las alteraciones clonales, un aumento del número de familias $V\beta$ que presentan unas alteraciones particulares y/o un aumento significativo de los mensajeros $V\beta$ en la sangre extraída según unos intervalos de tiempo importantes, permitirá estudiar la propagación de epítipo.

Dichas diferencias permitirán discriminar las respuestas T antes y después de un tratamiento de las respuestas más implicadas durante la regresión de la enfermedad debida a la terapia;

- distinción entre los procesos inmunes precoces de los usados desde hace mucho tiempo en el caso de enfermedades autoinmunes por ejemplo, y entre los procesos inmunes implicados en diferentes formas de una misma enfermedad;
- comparación de las representaciones gráficas suministradas por la invención con los resultados obtenidos mediante unas técnicas habituales de diagnóstico y de análisis inmunológico realizadas mediante otros métodos (por ejemplo: seguimiento de las células T mediante unos tetrámeros, seguimiento de la producción de las citoquinas mediante el método conocido con el nombre de Elispot) y posibilidad de correlacionar la evolución de la aparición y la desaparición de clones T a lo largo del tiempo con la evolución clínica del paciente para obtener unas informaciones importantes sobre la semiología y los procesos inmunes implicados en la enfermedad;
- se podrán observar diferentes modificaciones después del tratamiento de una enfermedad (desapariciones de clones, modificación de los valores cuantitativos, modificación de la topología global de los perfiles, etc.). Estas modificaciones pueden indicar una subregulación, la delección de clones autorreactivos o también la evolución de las células T implicadas. Esta semiología puede variar según la estrategia usada. En efecto, ciertos agentes pueden producir la apoptosis de las células autorreactivas mientras que las drogas citotóxicas tales como la ciclosporina o la mitoxantrona pueden conllevar modificaciones no específicas. Teóricamente, los perfiles de los pacientes obtenidos gracias a la invención podrían por lo tanto influir en la decisión del tratamiento. La invención puede asimismo ser útil para establecer unos criterios de tolerancia en unos pacientes aparentemente desprovistos de síntomas clínicos;
- posibilidad de identificar, a nivel periférico, unas representaciones específicas de ciertas enfermedades. Asimismo, se prevé la posibilidad de superponer las gráficas obtenidas a partir de la sangre, y las observadas en el seno del injerto (por ejemplo para la detección de señales de rechazo crónico a través de una extracción de sangre);

- el análisis según la invención sobre unas extracciones de pacientes podrá permitir definir un nuevo parámetro de selección de epítopos candidatos a una inmunoterapia (antitumoral por ejemplo) más eficaz;
- aislamiento de células T detectadas mediante la combinación de los primeros y de los segundos datos como particularmente implicadas en la reacción inmunitaria estudiada. Después se podrá realizar un análisis de la especificidad y de la funcionalidad de estas células T aisladas. Esta identificación y después aislamiento de células T que portan un TCR particular permite realizar unos estudios funcionales o fenotípicos por ejemplo, no en la población de células T totales sino únicamente en las células T implicadas en la reacción inmunitaria estudiada. Este enfoque de búsqueda de genes mejorado permitirá identificar nuevas estrategias de inmunoterapias. A título de ejemplo, véase la figura 14.

El objetivo de numerosos procedimientos vacunantes es desarrollar una respuesta T y, por lo tanto, medirla. La invención representa para ello una aportación nueva potencialmente muy útil. Además, el estudio de la topología de los repertorios representados puede ser importante para detectar las “firmas” específicas de un proceso patológico en un individuo. En efecto, la invención se podrá usar, por ejemplo, para analizar la evolución del proceso patológico en unos pacientes y/o para influenciar la decisión de un tratamiento.

En el campo de la investigación farmacéutica y médica, la invención servirá para la comprensión y el seguimiento de patologías y/o de tratamientos en diferentes campos tales como:

- virología;
- cancerología;
- enfermedades autoinmunes;
- tratamiento de las alergias (seguimiento de las desensibilizaciones);
- trasplante de órganos, de tejidos o de médula, anticipación de la aparición de un rechazo agudo o crónico, investigación de clones reguladores en unos pacientes injertados a fin de saber si éstos son susceptibles de ser tolerantes a su injerto en ausencia de cualquier tratamiento inmunosupresor, etc.

En la investigación médica, la invención servirá, por ejemplo, como herramienta clínica para la ayuda al diagnóstico (enfermedades víricas, enfermedades autoinmunes, cáncer) y el seguimiento de las terapias (vacunas, terapias celulares, terapias génicas).

La invención se puede usar sobre el animal en la ámbito de proyectos de investigación (ensayos animales, análisis preclínicos, etc.), y sobre el ser humano en el ámbito de la evaluación de tratamientos.

Otras características y ventajas de la invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de la siguiente descripción de varios modos preferidos de realización dados a título de ejemplos no limitativos haciendo referencia a los dibujos adjuntos:

- la figuras 1 a 8 son unos diagramas relativos al estudio de los linfocitos T y obtenidos con técnicas de la técnica anterior;
- las figuras 9, 11 a 13 son unos diagramas obtenidos con el procedimiento según la invención;
- la figura 10 es una representación esquemática de los medios de realización de la invención y del soporte obtenido;

- la figura 14 representa un ejemplo de clasificación. En este ejemplo, se ha obtenido un perfil TcLandscape a partir de un paciente que padece esclerosis en placa. En la gráfica, se observa que la familia V β 17 está alterada y que el número de transcritos V β 17 es importante. Se han aislado las células T que portan un TCR compuesto de los genes V β 17 mediante citometría de flujo, y se han realizado unos estudios funcionales sobre estas células aisladas. Se observa entonces una transcripción particularmente elevada de las citoquinas Il-6, Il-8 y TNF α en estas células. Esta acumulación no se observa en las células T que portan un TCR V β 17+ de un sujeto sano. Por otra parte, estas células V β 17+ aisladas a partir del paciente presentan un fenotipo activado.

Ejemplos

Se describirá un primer modo de realización del método según la invención en el contexto de la respuesta celular en xenotrasplante.

En trasplante, las células T pueden reconocer los péptidos antigénicos presentados por las células presentadoras del receptor (vía indirecta) o del donante (vía directa). Estando la vía de presentación directa particularmente implicada durante los rechazos agudos, se ha estudiado el impacto de este tipo de reconocimiento sobre el repertorio del TCR β . Gracias a la invención, que permite añadir una dimensión cuantitativa a las alteraciones cualitativas de la distribución

de las longitudes de la región CDR3, apareció que esta distribución no estaba alterada en el reconocimiento directo mientras que las células T se seleccionan en función de su segmento V β . Además, siguiendo la regulación de la expresión del TCR como marcador de activación, se muestra que una proporción importante de las células T no sometidas a tratamiento previo pueden reconocer unas células presentadoras “ajenas”, fenómeno que permite comprender mejor la amplitud de la respuesta directa y su implicación en el rechazo agudo.

El análisis del repertorio del TCR permite evaluar la diversidad de una población de linfocitos T y de seguir su evolución en diferentes condiciones experimentales o durante la progresión de una patología dada. Así, se pueden determinar unas restricciones (ausencia de ciertas familias V β) o unas alteraciones del repertorio (modificación de la repartición de las longitudes de la CDR3 en una familia V β).

Se han desarrollado diferentes técnicas a fin de analizar la región CDR3 y/o cuantificar las variaciones del repertorio a nivel de la cadena V β del TCR. Actualmente, el análisis cuantitativo del TCR se puede realizar mediante diferentes métodos: el RNase Protection Assay que adolece de la desventaja de ser difícil técnicamente, la cuantificación a partir de una PCR competitiva sobre CDR3, que no discrimina las diferentes familias V β , los anticuerpos monoclonales anti-V β . Para el análisis cuantitativo, numerosos anticuerpos monoclonales dirigidos contra las diferentes regiones variables del TCR $\alpha\beta$ están disponibles en el ser humano y en el ratón, y permiten un análisis de la expresión a nivel proteico. Sin embargo, en el ratón, sólo tres anticuerpos están disponibles y son eficaces, lo que limita el interés de este método. Además, el análisis únicamente a nivel proteico no tiene en cuenta los eventos de selección que se producen a nivel de la región CDR3, que es la base de la especificidad del reconocimiento del antígeno. Además, el porcentaje de expresión de una proteína V β no es representativo del porcentaje de transcritos V β correspondiente. En efecto, dicha cuantificación mediante unos anticuerpos tiene el riesgo de subestimar el número de TCR puesto que éstos son internalizados después de la activación. Otras técnicas, basadas en la amplificación mediante PCR de las regiones variables del TCR con la ayuda de cebadores específicos, permiten analizar el repertorio a partir de ADN genómico. Los productos de amplificación así obtenidos se pueden analizar mediante autorradiografía, se pueden clonar y se pueden secuenciar.

El análisis cualitativo de la cadena β del TCR (segundos datos) se basa en el estudio de la distribución de las longitudes de la región hipervariable CDR3 del TCR en cada familia V β de una población de linfocitos T dada. Un grupo de células T en reposo se caracteriza por una repartición gaussiana de las diferentes longitudes de la CDR3 en cada familia V β . La movilización de clones T específicos tras el reconocimiento de un antígeno se acompaña del uso preferente de ciertos TCR compuestos de una familia V β y de una longitud de la CDR3 particular.

El principio de la técnica Immunoscope[®] consiste en una amplificación, mediante PCR, de las diferentes regiones CDR3 usando un cebador 3' común dispuesto en el segmento C β y un cebador 5' específico de cada familia V β (véase la lista de secuencias). Después, los productos amplificados se someten a una etapa de elongación efectuada con un segundo cebador C β marcado con un fluoróforo. Los productos de amplificación fluorescentes se separan en función de su longitud mediante migración sobre gel de poliacrilamida. El perfil de migración se analiza mediante un secuenciador de ADN conectado al programa Immunoscope[®]. Así, se obtiene, con referencia a la figura 5, una imagen de la distribución de las longitudes CDR3 para cada par de cebadores. Se pueden observar entre 1 y 11 picos de amplificación que corresponden cada uno a un tamaño particular de la región CDR3 y separados cada uno por tres nucleótidos. Este análisis se puede afinar todavía más si se usa un cebador específico de un segmento J β en lugar del cebador común C β . Como se ilustra en la figura 6, el análisis de la repartición de las diferentes longitudes de CDR3 permite identificar eventuales expansiones oligoclonales.

El programa Reperturb permite comparar la distribución de las longitudes CDR3 en una muestra dada con la obtenida en un individuo de referencia (perfil gaussiano, no alterado). Cada longitud CDR3 analizada mediante el programa Immunoscope[®] se traduce en probabilidad de distribución, teniendo en cuenta el espacio bajo la curva de cada pico. Para cada una de ellas, la diferencia de valor absoluto entre la muestra (Rn) y el perfil de referencia (Cn) permite obtener el porcentaje de alteración de la muestra con relación a un perfil gaussiano. Este análisis permite por lo tanto precisar el nivel de alteración observado en un perfil Immunoscope[®]. Las variaciones obtenidas para cada expansión CDR3 en una familia V β se expresarán, por lo tanto, en porcentaje de alteración de un pico dentro de esta familia. La suma de las alteraciones en todas las familias V β permite estimar el porcentaje de alteración global de la cadena V β del TCR en una población de células T.

Después, es preciso efectuar la cuantificación de los transcritos V β que se puede abordar mediante varias técnicas. En este caso, se puede usar el método de PCR cuantitativa en tiempo real. Este procedimiento, basado en el uso de la tecnología TaqMan[®], puede usar el programa conocido con el nombre de “ABI Prism 7700 Sequence Detection System” que permite entre otros, detectar y medir la fluorescencia emitida por el enlace de un marcador (Sybr[®]Green) a las moléculas de ADN de doble hebra. El nivel de fluorescencia, directamente proporcional a la cantidad del producto en un pocillo, se colecta durante cada ciclo de amplificación. Paralelamente a las muestras, se puede usar un estándar, que corresponde a una gama de dilución de la secuencia diana, y permitirá establecer una curva patrón que se usa para deducir la cantidad de la diana en cada muestra. A fin de eliminar las variaciones experimentales entre las diferentes muestras, estos valores se indican en la medición del gen de regulación HPRT.

A fin de mejorar la especificidad y la sensibilidad de la PCR, se usa la enzima denominada polimerasa AmpliTaq Gold[®] DNA. Una modificación de esta enzima la activa únicamente a temperaturas elevadas, temperatura a la que el ADN está completamente desnaturalizado. A fin de evitar una contaminación con otros productos de PCR, se añade

ES 2 301 668 T3

AmpErase® uracil-N-glicosilasa (UNG) a la mezcla de reacción en el momento de la dosificación. Esta enzima, activa únicamente por debajo de 60°C, actúa hidrolizando los puentes de uracilo a nivel del ADN hebra simple o doble que contienen las bases uracilos y que no tiene ninguna actividad sobre el ADN que contiene unos timidinas. Esos puentes de uracilo se generan mediante la introducción de las bases dUTP en la mezcla de reacción. Durante la amplificación, una etapa inicial de 2 minutos a 50°C activa esta amperasa y permite la eliminación de eventuales contaminantes procedentes de la amplificación anterior.

Los estándares se preparan a partir de ARN retrotranscritos procedentes de esplenocitos de un animal no tratado previamente, o bien de linfocitos T procedentes de la sangre de individuos sanos en el ser humano. Para la preparación de cada estándar $V\beta$, se realiza la amplificación en un termociclador clásico. Después, los productos de PCR se depositan a continuación sobre un gel de agarosa y se extrae la banda de interés. La concentración del producto de PCR se estima mediante el valor DO_{260} y después, en función de la masa molecular, se calcula el número de copias por ml. Después, se preparan unas diluciones de cada estándar $V\beta$, $C\beta$ o HPRT a 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 y 10^2 copias por pocillo, a fin de obtener una gama de concentración que cubre la de las muestras.

A fin de validar cada estándar, se realiza una segunda PCR, esta vez en el *ABI PRISM 7700 Sequence Detector* en presencia del marcador fluorescente Sybr®Green. Después, los productos de PCR se depositan sobre un gel de agarosa, lo que permite controlar la disminución decreciente de cada banda en función de la dilución, así como el tamaño del producto de PCR. En paralelo, el aumento de la intensidad de fluorescencia, seguido en función del tiempo, se relaciona con el número de copias de ADN contenidas en cada dilución. Esto permite verificar la precisión de las diluciones del estándar, el rendimiento de la PCR y la ausencia de contaminación.

Una vez validados, estos estándares permiten deducir el número de copias de la diana en cada muestra, ensayada por duplicado, indicando el nivel de fluorescencia en la línea patrón. Esta línea se tiene en cuenta sólo si la eficacia de la PCR es cercana de 100% (pendiente = -3,3) y si el coeficiente de correlación es superior a 0,95.

Después, se trata de combinar los análisis cualitativos y cuantitativos para dar una dimensión cuantitativa a las alteraciones de la repartición de las longitudes de las CDR3. Esta información puede permitir evaluar la representatividad de una expansión oligoclonal en una población dada y puede asimismo permitir visualizar unas modificaciones del repertorio que no están asociadas a unas alteraciones a nivel de la región CDR3.

Se podrá usar un programa informático desarrollado a fin de obtener una imagen que contiene el conjunto de las informaciones relativas al repertorio estudiado. Para este fin, se puede usar el programa de marca Matlab® puesto que permite así la gestión flexible de un volumen muy grande de datos, y una puesta en imagen suficientemente clara e informativa. Para cada familia $V\beta$, el porcentaje de alteración con relación al perfil gaussiano se mide mediante el método de Gorochov. Gracias al programa Matlab®, estos valores se combinan con los primeros datos (cuantitativos) a fin de obtener una representación 3D que ilustra las variaciones al mismo tiempo cualitativas y cuantitativas del transcriptoma $V\beta$ en la que la altura de los picos ilustra la cantidad de transcritos correspondientes $V\beta$ mientras que los porcentajes de alteraciones se ilustran mediante un código de color.

En la gráfica de la figura 9, aparecen:

- en abscisas, cada una de las familias $V\beta$;
- en ordenadas, los datos cuantitativos (es decir la importancia relativa de cada familia $V\beta$);
- según el eje Z, las diferentes longitudes posibles de la CDR3; y
- siguiendo un código de colores, una visualización de las alteraciones del repertorio con relación a un perfil gaussiano.

El código de colores puede comprender una serie de colores, por ejemplo del verde al rojo en el sentido de la alteración creciente, es decir a medida que se aleja del 0% de alteración. En el ejemplo, se tratará de diferentes niveles de grises, siendo el gris cada vez más oscuro a medida que aumenta la alteración.

Así, los transcritos $V\beta$ alterados o no se expresan según una gráfica tridimensional que presenta en abscisas cada familia $V\beta$ y en ordenadas los datos cuantitativos obtenidos mediante TaqMan (PCR TaqMan de $C\beta$ y de cada especie de ARNm $V\beta$). El porcentaje de alteración de cada $V\beta$ con relación a un perfil gaussiano se visualiza según un código de color (a cada color corresponde un "intervalo" de alteraciones).

El procedimiento se usará mediante una instalación que permite el análisis de los receptores de los linfocitos T de un organismo, ilustrada esquemáticamente en la figura 10. Esta instalación comprenderá unos medios automatizados para amplificar la región CDR3 de cada uno de los genes $V\beta$ de los receptores de los linfocitos T asociados al organismo (obtención de los segundos valores), y para cuantificar cada gen $V\beta$ (primeros datos). Podrá tratarse, por ejemplo, de una máquina (2) tal como el aparato TaqMan® que permite, gracias a un seguimiento de las amplificaciones en tiempo real, cuantificar los transcritos $V\beta$ durante su amplificación: los valores cuantitativos así obtenidos permiten comparar unas cantidades de transcritos de una cierta familia $V\beta$ con unas cantidades de transcritos de otra familia $V\beta$ (ejemplo de aparato: ABI Prism 7900 de la compañía Applied Biosystems).

La instalación comprenderá asimismo unos medios automatizados para medir las cantidades relativas de cada longitud de la región CDR3 en cada familia $V\beta$, y la relación de estas cantidades con valores predeterminados para obtener unos segundos datos. Podrá tratarse de un secuenciador (4) que permite conocer la parte relativa de cada transcrito que presenta un tamaño particular de la CDR3 en una familia $V\beta$ dada, pero que no permite comparar las familias $V\beta$ entre sí: (por ejemplo el secuenciador capilar Megabace de la compañía Amersham pharmacia biotech).

Por último, la instalación comprenderá unos medios automatizados para representar en un diagrama de cuatro variables los primeros y los segundos datos en función de los genes $V\beta$ y de la longitud de las regiones CDR3. Podrá tratarse de un ordenador (6) mandado por un programa desarrollado, por ejemplo, con la ayuda del programa Matlab® citado anteriormente. El desarrollo de dicho programa en sí está al alcance del experto en la materia y no se detallará más aquí. Eventualmente, este programa será apropiado para mandar otras etapas de desarrollo del procedimiento, incluso de la integridad de éste. El diagrama se representará sobre un soporte de informaciones tal como una pantalla de ordenador o un soporte de papel (8).

Este estudio se puede realizar durante la cinética de una respuesta inmune en diferentes situaciones.

En este contexto de realización como en otros, la invención permite realizar unos análisis más avanzados que con los métodos de la técnica anterior. La invención permite tener una visión general y tridimensional del tamaño del grupo de células T que usan una reestructuración $V\beta$ particular, y permite, por lo tanto, conocer la importancia cuantitativa de las familias $V\beta$ seleccionadas durante la respuesta inmune.

Así, con referencia a la figura 11 que da un ejemplo de aspecto de diagrama no relacionado con unas circunstancias biológicas particulares, aparece que ciertas familias, aunque altamente alteradas con relación al perfil gaussiano, están sólo poco representadas a nivel cuantitativo y, por lo tanto, no parecen desempeñar un papel preponderante (ejemplo: familia x). La invención permite asimismo diferenciar una situación de reposo de una situación en la que las células T están activadas de manera policlonal. En efecto, la gráfica presentada en la figura 12 procede de un modelo en el que unas células T están activadas de manera policlonal, y se observa entonces una movilización muy alta de ciertas familias $V\beta$ que, sin embargo, presentan una distribución gaussiana de las longitudes de CDR3 (lo que corresponde al 0% de alteración). Así, esta técnica permite entre otros, visualizar unas activaciones policlonales (ConA, superantígeno, vía de presentación directa) que no se habrían detectado mediante las herramientas habituales. Por lo tanto, se trata de un medio potente para seguir las evoluciones del repertorio durante diferentes respuestas inmunitarias.

En efecto, la gráfica procede de un modelo en el que unas células T se activan *in vitro*, y se observa una movilización muy alta de ciertas familias $V\beta$. En esta misma escala, una muestra de control daría un perfil verde (gris claro) porque todas las familias presentan una distribución gaussiana de las longitudes de CDR3 (lo que corresponde al 0% de alteración) y plana porque todas las familias $V\beta$ están poco representadas. Por lo tanto, se trata de un medio potente para seguir las evoluciones del repertorio durante diferentes respuestas inmunitarias.

En la figura 13, se ha ilustrado el diagrama resultante de un segundo modo de realización de la invención. La invención se usa en este caso en el ámbito de un estudio realizado sobre unos pacientes que padecen melanoma y vacunados. La familia $V\beta 13$ parece particularmente implicada en la respuesta anti-melanoma en la medida en la que aparece un pico rojo (gris oscuro), y por lo tanto alejado del perfil gaussiano característico de una respuesta normal, y cuantitativamente importante. Otra familia parece desempeñar un papel menos importante: la familia $V\beta 23$ que está perturbada pero poco importante a nivel cuantitativo. Además, un macizo aparece a nivel de las primeras familias $V\beta$. Éste podría corresponder a un efecto de la vacunación. Unos estudios complementarios permitirán determinarlo.

A continuación, se describirá un modo de realización en el que el procedimiento de la invención se completa por una etapa de aislamiento de los clones que presentan unas familias $V\beta$ alteradas.

Las alteraciones específicas del repertorio detectadas con la ayuda de la invención no son, muy a menudo, detectables mediante unas técnicas habituales de citometría de flujo. En efecto, mientras que la invención permite detectar una alteración y una acumulación de transcritos para una familia $V\beta$ dada, la citometría de flujo permite sólo detectar la expresión membranaria de la proteína $V\beta$. Ahora bien, la expresión proteica en superficie es transitoria y no permite detectar una modificación de la actividad transcripcional de una célula en un momento preciso.

Como ya se ha observado, la invención permite así detectar una modificación de la actividad transcripcional para una familia dada. Una vez la familia detectada, es posible extraerla del resto de la población linfocitaria a fin de estudiar sus características específicas (fenotipo, activación, etc.). En efecto, si se estudiaran estas características en la población total, serían enmascaradas por la suma de las características de todas las demás poblaciones de células T.

El presente modo de representación permite, por lo tanto, identificar unas poblaciones particulares implicadas en la respuesta inmunitaria estudiada. Estas células T, que portan un TCR compuesto de una familia $V\beta$ particular, se pueden aislar después mediante citómetro de flujo con la ayuda de anticuerpos anti- $V\beta$ por ejemplo, lo que hace posible la caracterización de los clones portadores de alteraciones específicas (cualitativas y/o cuantitativas) del repertorio de la cadena β del TCR.

Después del uso de la invención como se expone en los modos anteriores, incluyendo la etapa de realización del diagrama, las células que expresan las diferentes familias $V\beta$ caracterizadas por unas expansiones oligoclonales y/o

ES 2 301 668 T3

grandes cantidades de ARN mensajeros, se sacan mediante citometría de flujo gracias a unos anticuerpos dirigidos contra las diferentes familias V β .

Así, cada familia V β antes de la selección representa menos del 5% del repertorio V β . Después de la selección, se puede trabajar sobre una población dada muy pura puesto que la pureza obtenida es superior a 98%.

Varias selecciones sucesivas son posibles y, por lo tanto, se pueden aislar varios clones de células T a partir de una misma extracción puesto que después de la selección de una población de células T particular, la población que queda comprende todos los demás tipos de células T. Este mismo extracto celular que ha permitido aislar una primera población de células T podrá, por lo tanto, asimismo servir de base para la extracción de otra familia V β . Las posibilidades y las aportaciones de esta técnica son, por lo tanto, muy importantes y mejoran la técnica de base de la invención. Una vez determinado el número de células extraídas, las células se usan para unos estudios fenotípicos y transcripcionales.

Estos estudios son fundamentales puesto que permitirán determinar el papel de un clon linfocitario en una situación dada. Esta determinación del papel de los clones de células T es muy importante en la medida en la que el clon identificado resulta tener una función citotóxica (virus tales como VIH; CMV; EBV; enfermedades autoinmunes) será preciso inhibirlo en el marco de estrategias de inmunoterapias. Por el contrario, si este clon resulta tener una función protectora (trasplante, tratamientos inmunosupresores), convendrá estimularlo para obtener un efecto beneficioso.

Para la realización de esta técnica, se podrá usar un citómetro en flujo que permite aislar las células T detectadas mediante la tecnología según la invención, después del marcado de las poblaciones de células T consideradas con un anticuerpo anti-V β , tal como el comercializado con la denominación "Facsclibur" por la compañía Beckton Dickinson.

Tal como se ilustra en la figura 14, la invención se refiere asimismo a un procedimiento que permite la identificación, en unas poblaciones de linfocitos T particulares, de genes, de moléculas y de mecanismos implicados en unos procesos fisiopatológicos.

Se usa el procedimiento de análisis según la invención y se pueden aislar las poblaciones de células T para las cuales los transcritos de TCR están muy representados entre el conjunto de los transcritos de la población de células T total, y comparar el fenotipo de estas células con relación al fenotipo de las células de la población general, permitiendo así demostrar las vías de respuesta a estímulos.

Evidentemente, se podrán aportar numerosas modificaciones como por ejemplo en el diagrama, la variable representada por unas diferencias de aspecto local del diagrama podrá ser diferente a la que corresponde a los segundos datos.

La diferencia de aspecto local se podrá ilustrar de otra manera diferente de unos colores o matices de gris. Por ejemplo, podrá tratarse de diferentes tipos de rayados o de otros tipos de señales.

La invención se refiere asimismo a cada cebador para la amplificación de las regiones CDR3, tales como las indicadas en el listado de secuencias.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de análisis de la activación y de la movilización de las células T por medio de un análisis de los receptores de los linfocitos T de un organismo, **caracterizado** porque comprende las etapas siguientes:

- determinar el número de transcritos para cada gen $V\beta$, para obtener unos primeros datos.
- amplificar la región CDR3 de los receptores de los linfocitos T para cada uno de los genes $V\beta$ asociados al organismo,
- separar las diferentes longitudes de la CDR3 de los receptores de los linfocitos T para cada uno de los genes $V\beta$ asociados al organismo, y estimar la proporción de los transcritos de cada longitud de la CDR3 en cada familia $V\beta$ para obtener unos segundos datos,
- representar en un diagrama de cuatro variables los primeros y los segundos datos en función de los genes $V\beta$ y de la longitud de las regiones CDR3.

2. Procedimiento según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque al menos una de las variables está representada sin estar asociada a una dimensión del espacio.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la variable que no está asociada a una dimensión del espacio corresponde a los segundos datos.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque al menos una de las variables está representada por diferencias de aspecto local del diagrama.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque las diferencias de aspecto local son unas diferencias de color.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque los primeros datos están representados siguiendo la dirección vertical.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque comprende, después de la determinación de los primeros y de los segundos datos, las etapas que consisten en elegir un gen $V\beta$ en función de los resultados de las dos primeras etapas, y en extraer de la población de células T total las células T que portan un TCR constituido por esta familia $V\beta$ previamente elegida.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque al menos algunas de las etapas se realizan de manera automatizada.

9. Instalación de análisis de los receptores de los linfocitos T de un organismo, **caracterizada** porque comprende:

- unos medios automatizados para amplificar la región CDR3 de los receptores de los linfocitos T para cada gen $V\beta$ asociado al organismo;
- unos medios automatizados para medir las cantidades de cada gen $V\beta$ para obtener unos primeros datos;
- unos medios automatizados para medir, para cada gen $V\beta$, la cantidad relativa de cada región CDR3 con relación a la totalidad de las regiones CDR3 asociadas a un gen $V\beta$ para obtener unos segundos datos; y
- unos medios automatizados para representar en un diagrama de cuatro variables los primeros y los segundos datos en función de los genes $V\beta$ y de la longitud de las regiones CDR3.



FIG. 1

Immunoscope®

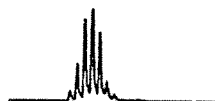


FIG. 2

Reperturb®

Porcentaje de alteración

Porcentaje de alteración

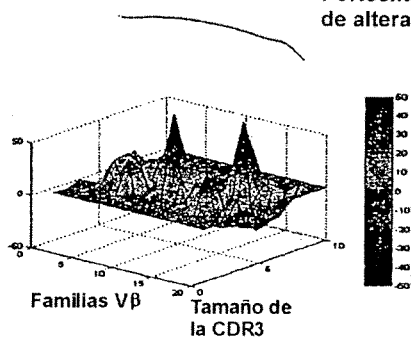


FIG. 3

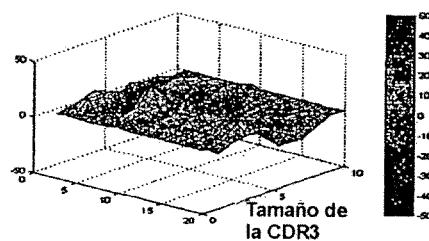
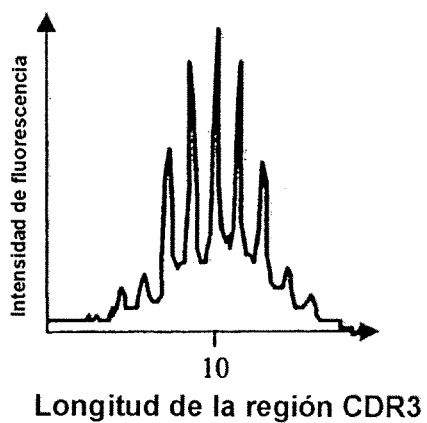
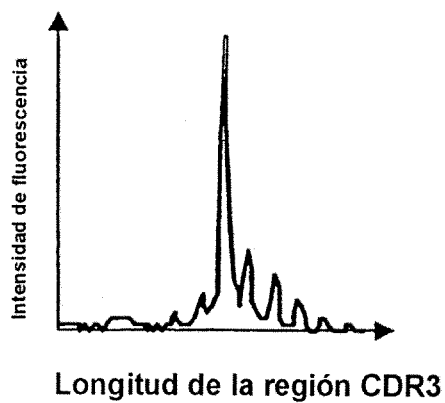


FIG. 4



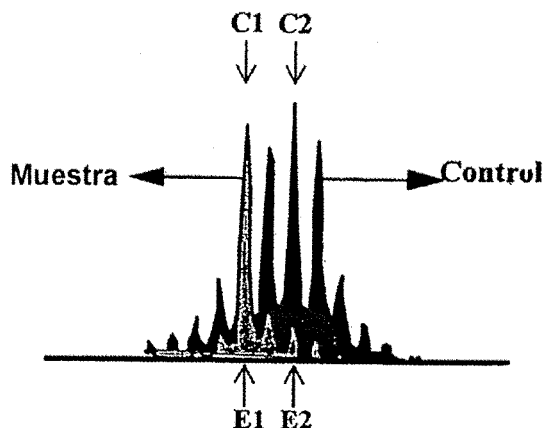
Expansión policlonal

FIG. 5



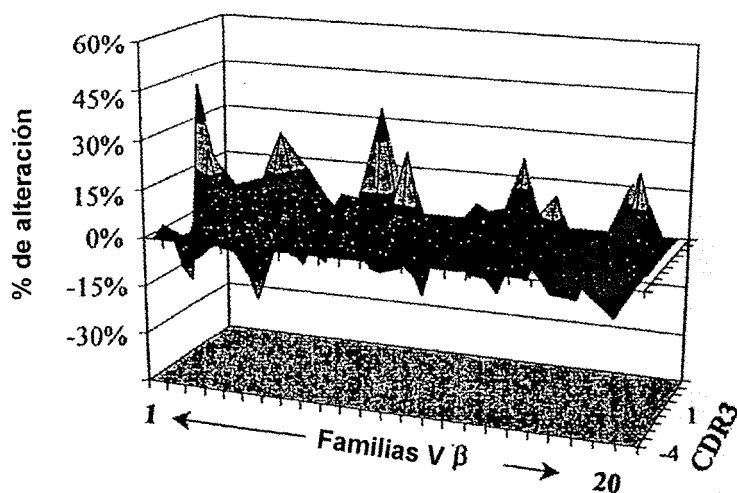
Expansión oligoclonal o monoclonal

FIG. 6



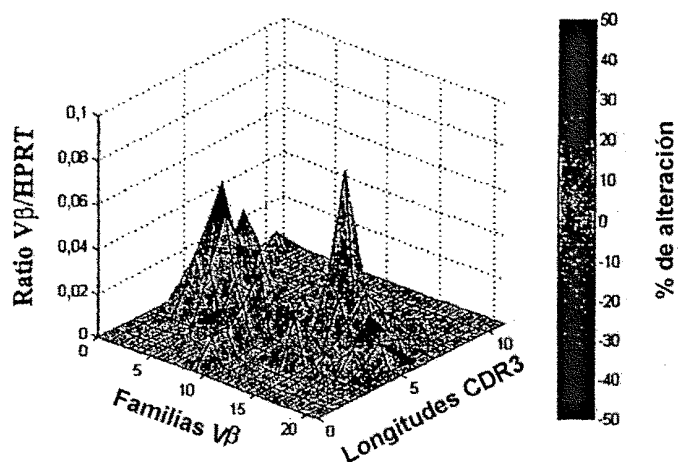
Principio del análisis de las perturbaciones del repertorio mediante el programa Reperturb®. El espacio debajo de la curva de cada pico de la muestra (En) se compara con el del pico correspondiente en el perfil de referencia (Cn).

FIG. 7



Representación global de las alteraciones del TCR evaluadas mediante Reperturb®. El porcentaje de alteración (eje Z) en cada familia Vβ (eje X) se expresa en función de las diferentes longitudes de CDR3 (eje Y).

FIG. 8



La representación gráfica mediante TcLand® permite combinar las informaciones cualitativas que se refieren a las alteraciones de la distribución de las longitudes CDR3 (escala colorimétrica) con las mediciones cuantitativas de la expresión de cada familia VB (eje Z) en una población de linfocitos T.

FIG. 9

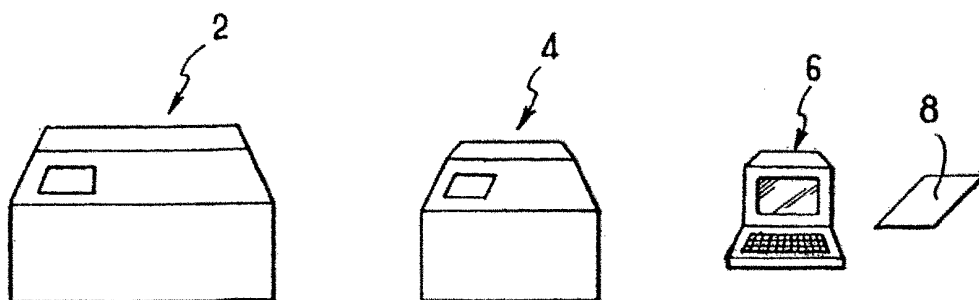


FIG 10

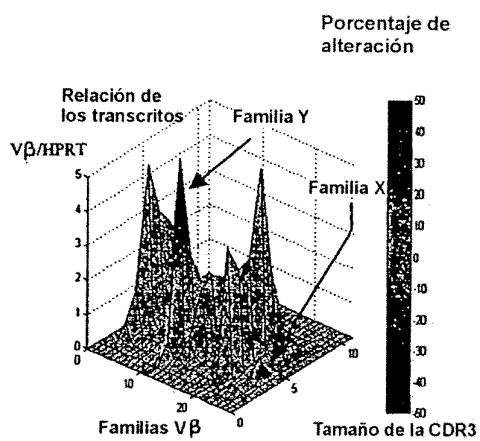


FIG.11

TcLand

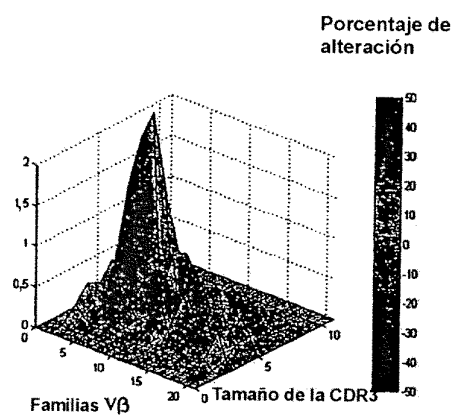


FIG.12

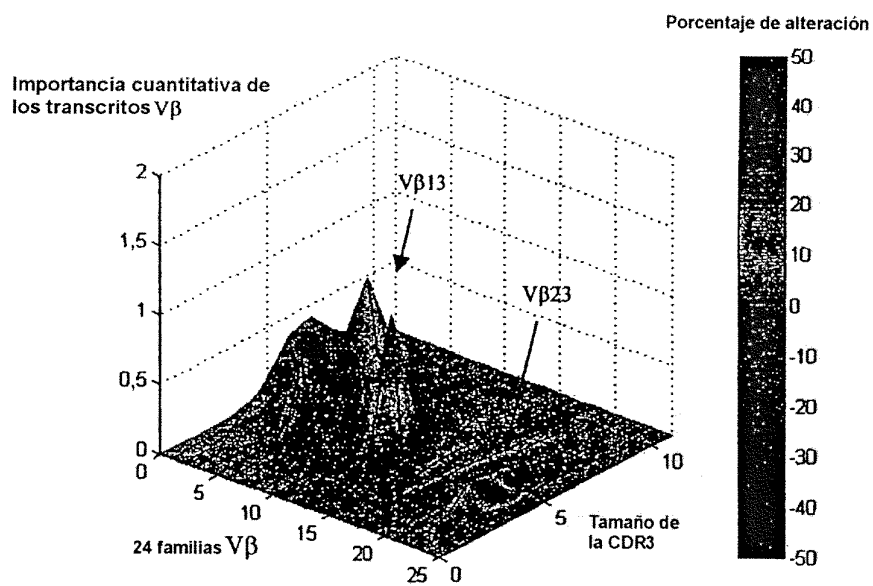


FIG.13

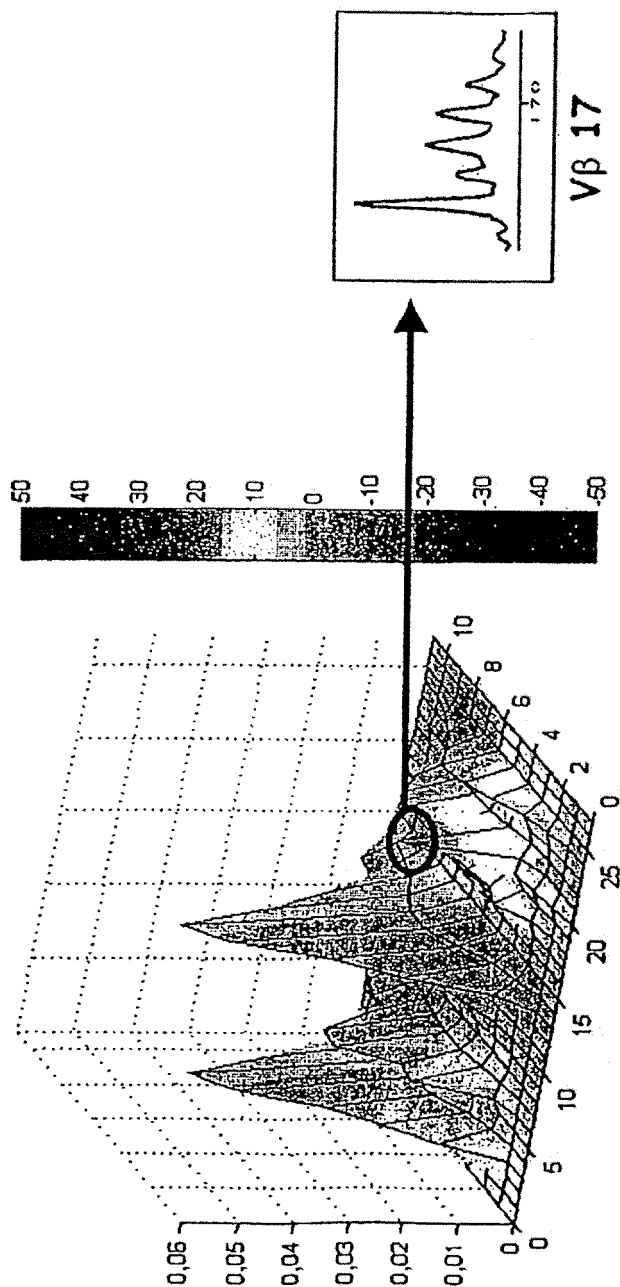


FIG. 14

ES 2 301 668 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Institut National de la Santé et de la Recherche - INSERM

5 <120> Procedimiento de análisis de los linfocitos T por medio de los receptores de los linfocitos T de un organismo

<130> D19540

10 <150> US 06/283378

<151> 13-04-2001

<160> 61

15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20

<211> 20

<212> ADN

<213> *Rattus rattus*

25

<400> 1

tctccttccc attcacccac

20

30

<210> 2

<211> 28

<212> ADN

35

<213> *Rattus rattus*

<400> 2

tgactccacc caaggtctcc ttgtttga

28

40

<210> 3

<211> 22

<212> ADN

45

<213> *Rattus rattus*

<400> 3

50

gaatgcccag aaaagtccaa gt

22

<210> 4

<211> 22

55

<212> ADN

<213> *Rattus rattus*

60

<400> 4

ggcagaactc tgtactgcac ct

22

65

<210> 5

<211> 22

<212> ADN

ES 2 301 668 T3

	<213> <i>Rattus rattus</i>	
	<400> 5	
5	tcaaattcac ctggagcct ag	22
	<210> 6	
10	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus rattus</i>	
15	<400> 6	
	ctgagtgctc cttaaactct ccc	23
20	<210> 7	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus rattus</i>	
25	<400> 7	
	aagtcgcttc caacctcaca a	21
30	<210> 8	
	<211> 22	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Rattus rattus</i>	
	<400> 8	
40	tgagatgaac atgagtcct tg	22
	<210> 9	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus rattus</i>	
	<400> 9	
50	agaggcagat ggctgttat ctc	23
	<210> 10	
55	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus rattus</i>	
60	<400> 10	
	ccctgattct ggagctgct aa	22
65	<210> 11	
	<211> 24	
	<212> ADN	

ES 2 301 668 T3

	<213> <i>Rattus rattus</i>	
	<400> 11	
5	cttctctctc attctggagt cagc	24
	<210> 12	
10	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus rattus</i>	
15	<400> 12	
	gagtcggctt cccctct	18
20	<210> 13	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus rattus</i>	
25	<400> 13	
	tgctctctta acatcacctc tgc	23
30	<210> 14	
	<211> 22	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Rattus rattus</i>	
	<400> 14	
40	agtcgcttct tgcctcagtc tt	22
	<210> 15	
	<211> 22	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus rattus</i>	
	<400> 15	
50	tgaagatcca gaccacacaa cc	22
	<210> 16	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus rattus</i>	
60	<400> 16	
	tcatccatct ccacgctgaa	20
65	<210> 17	
	<211> 24	
	<212> ADN	

ES 2 301 668 T3

	<213> <i>Rattus rattus</i>	
	<400> 17	
5	cagagtgact cagccaccta tctc	24
	<210> 18	
10	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus rattus</i>	
15	<400> 18	
	tcactcactc tggettctac ctct	24
20	<210> 19	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus rattus</i>	
25	<400> 19	
	cacatcctga tgacagaggc tt	22
30	<210> 20	
	<211> 22	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Rattus rattus</i>	
	<400> 20	
40	ctctgaagat ccaacgcaca ac	22
	<210> 21	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus rattus</i>	
	<400> 21	
50	gctcagtggtg tcccagactt aca	23
	<210> 22	
55	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus rattus</i>	
60	<400> 22	
	aacgcaagac ctgaagacag c	21
65	<210> 23	
	<211> 24	
	<212> ADN	

ES 2 301 668 T3

	<213> <i>Rattus rattus</i>	
	<400> 23	
5	agatcaagtc cagcaagcta acag	24
	<210> 24	
10	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus rattus</i>	
15	<400> 24	
	cactgtacct gtgtccagc a	21
20	<210> 25	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus rattus</i>	
25	<400> 25	
	cactgatgtt ctgttgaca gggt	24
30	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Rattus rattus</i>	
	<400> 26	
40	gtgaatggga aggagatccg	20
	<210> 27	
	<211> 25	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus rattus</i>	
	<400> 27	
50	ttctggcaca atcctcgaa ccact	25
	<210> 28	
55	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 28	
	tggcctccca tctcttcat cacatct	27
65	<210> 29	
	<211> 21	
	<212> ADN	

ES 2 301 668 T3

	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 29	
5	ggacaggact gaacgtcttg c	21
	<210> 30	
10	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 30	
	ttgagcacac agagggtac a	21
20	<210> 31	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 31	
	tactgcctga gcagccgcct ga	22
30	<210> 32	
	<211> 19	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 32	
40	ggtcgctgtg ttgagcca	19
	<210> 33	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 33	
50	tcctgggtcc actcgtcatt	20
	<210> 34	
55	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 34	
	tgttcccacc cgaggtcgct g	21
65	<210> 35	
	<211> 22	
	<212> ADN	

ES 2 301 668 T3

	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 35	
5	gatctctgct tctgatggct ca	22
	<210> 36	
10	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 36	
	ttccctgact tgcactctga ac	22
20	<210> 37	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 37	
	cctgaccttg tccactctga ca	22
30	<210> 38	
	<211> 22	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 38	
40	ccagcaccaa ccagacatct at	22
	<210> 39	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 39	
50	taccgtcagc aacctggaca	20
	<210> 40	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 40	
	gggccttcag ttctctttg	20
65	<210> 41	
	<211> 20	
	<212> ADN	

ES 2 301 668 T3

	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 41	
5	agctgaatgt gaacgccttg	20
	<210> 42	
10	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 42	
	gatcacacag gtgctggagt ct	22
20	<210> 43	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 43	
	atccaatttc tgaacacaac cg	22
30	<210> 44	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 44	
40	gatcacacag gagctggagt ctc	23
	<210> 45	
	<211> 22	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 45	
50	caagtcgett ctcacctgaa tg	22
	<210> 46	
55	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 46	
	ttctggtaca gacagaccat gatg	24
65	<210> 47	
	<211> 22	
	<212> ADN	

ES 2 301 668 T3

	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 47	
5	tcttcacatc aattccctgg ag	22
	<210> 48	
10	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 48	
	cctctcagta cctctgtgcc ag	22
20	<210> 49	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 49	
	gcccaagaca caaggtcaca g	21
30	<210> 50	
	<211> 19	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 50	
40	agacctggga catgggctg	19
	<210> 51	
	<211> 19	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 51	
50	tcgacaagac ccagggctg	19
	<210> 52	
55	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 52	
	gatggttata gtgtctccag agcaa	25
65	<210> 53	
	<211> 22	
	<212> ADN	

ES 2 301 668 T3

	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 53	
5	aggagatgt tcctgaagg ta	22
	<210> 54	
10	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 54	
	tctgatgat acagtgtctc tcgac	25
20	<210> 55	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 55	
	tctactctga aggtgcagcc tg	22
30	<210> 56	
	<211> 22	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 56	
40	ttctctctca ctgtgacatc gg	22
	<210> 57	
	<211> 22	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 57	
50	cttatttctg tgccagctca cc	22
	<210> 58	
55	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 58	
	ctccactctc aagatccagc ct	22
65	<210> 59	
	<211> 21	
	<212> ADN	

ES 2 301 668 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 59

5 ccacaaagct ggaggactca g 21

<210> 60

10 <211> 22

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 60

cccagttcct catttcgttt ta 22

20 <210> 61

<211> 22

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 61

ctttctgctt tcttgacatc cg 22

30

35

40

45

50

55

60

65