



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 152 424**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/74** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**A61K 38/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **95930790 .1**  
96 Fecha de presentación : **31.07.1995**  
97 Número de publicación de la solicitud: **0776339**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.06.1997**

54 Título: **Complejos del MHC y usos de los mismos.**

30 Prioridad: **29.07.1994 US 283302**  
**01.02.1995 US 382454**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.02.2001**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **05.07.2010**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **05.07.2010**

73 Titular/es: **Sunol Molecular Corporation**  
**2810 North Commerce Parkway**  
**Miramar, Florida 33025, US**

72 Inventor/es: **Wong, Hing, C.;**  
**Rhode, Peter, R.;**  
**Weidanz, Jon, A.;**  
**Grammer, Susan;**  
**Edwards, Ann, C.;**  
**Chavaillaz, Pierre-Andre y**  
**Jiao, Jin-An**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 152 424 T5

## DESCRIPCIÓN

Complejos del MHC y usos de los mismos.

## 5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud es una continuación en parte de la solicitud de EE.UU. en tramitación junto con la presente número de serie 08/382.454, presentada el 1 de Febrero de 1995, que es una continuación en parte de la solicitud número de serie 08/283.302, presentada el 29 de Julio de 1994, ambas aplicaciones mencionadas incorporadas completamente aquí mediante referencia.

## Antecedentes de la invención

### 1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a un complejo de fusión del MHC, un constructo de DNA, un vector, un uso y una composición farmacéutica como los definidos en las reivindicaciones adjuntas. Más particularmente, la invención se refiere a complejos de fusión del MHC que contienen una molécula del MHC con una ranura que se une a los péptidos y un péptido de presentación conectado covalentemente a la proteína del MHC. Los complejos de fusión de la invención son útiles para una variedad de aplicaciones incluyendo rastreos *in vivo* para la identificación y el aislamiento de péptidos que modulan la actividad de células T seleccionadas, incluyendo péptidos que son antagonistas y agonistas parciales de receptores de células T, métodos para suprimir una respuesta inmunitaria de un mamífero y métodos para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero.

### 2. Antecedentes

Las respuestas de células T específicas para antígenos están provocadas por péptidos antigénicos unidos a la ranura o hendidura de unión de glicoproteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) como parte del mecanismo del sistema inmunitario para identificar y responder a antígenos extraños. Los péptidos antigénicos unidos interactúan con receptores de células T y de ese modo modulan una respuesta inmunitaria. Los péptidos antigénicos se unen por medios no covalentes a "bolsas de unión" particulares comprendidos por residuos polimórficos de la ranura de unión de las proteínas del MHC.

Las moléculas del MHC de clase II son glicoproteínas heterodímeras que consisten en cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . Los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de estas moléculas se pliegan entre sí para formar una ranura de unión a péptidos. Los péptidos antigénicos se unen a la molécula del MHC a través de la interacción entre aminoácidos de anclaje sobre el péptido y los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ . La estructura cristalina del complejo HLA-DR1 de clase II humano con un péptido de influenza virus indica que los extremos N- y C-terminales del péptido unido se extienden más allá de la ranura de unión de modo que el extremo C del péptido está próximo al extremo N de la cadena  $\beta$  [Brown, J. H. y otros (1993) Nature 364: 33-39; Stern, L.J. y otros (1994) Nature 368: 215-221]. Las moléculas del MHC de clase I tienen organizaciones de dominios diferentes que las moléculas del MHC de clase II, pero generalmente una estructura similar con un sitio o una ranura de unión a péptidos que es distal a los dominios de membrana [véase, por ejemplo, Rudensky, A.Y. y otros (1991) Nature 353:622-626]. Véanse también las Patentes de EE.UU. 5.284.935; 5.260.422; 5.194.425; 5.130.297 y WO 92/18150 y WO 93/10220 para los análisis de las moléculas del MHC.

Las moléculas del MHC complejadas con péptidos antigénicos pueden inducir la inmunosupresión selectiva mediante varios mecanismos diferentes [véase, por ejemplo, Guery, J. y otros (1993) Critical Reviews in Immunology 13 (3/4): 195-206].

Más específicamente, se ha presentado que los complejos de péptido-MHC sobre la superficie de células que presentan antígenos sólo inducirán la expansión clonal de una línea de células T específica para el péptido unido al MHC si las células que presentan antígenos también aportan señales co-estimulantes. Un sistema propuesto se beneficia de este requerimiento para la activación de células T e inhibe el desarrollo de células T mediante la interacción con el péptido antigénico unido a la molécula del MHC en ausencia de señales co-estimulantes. Véanse Nicolle, M. y otros, J. Clin. Invest. (1994) 93: 1361-1369; y Sharma, S. y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88: 11465-11469.

Otro sistema propuesto inhibe el desarrollo de células T con moléculas del MHC que contienen un péptido unido que es un antagonista o un agonista parcial de un receptor de células T (TcR). Véase Evavold, B. y otros, Immunology Today (1993) 14(12): 602-609.

Se ha intentado la modificación de los péptidos antigénicos unidos a receptores de células T para examinar residuos sensibles a respuestas de células T específicas. La determinación de tales aminoácidos "activantes" de los péptidos antigénicos podría proporcionar una revelación de la secuencia adecuada de un agonista parcial o un antagonista de TcR. Véase Evavold, B. y otros, anteriormente.

También se ha especulado que podrían desarrollarse nuevas vacunas basadas en la determinación de la naturaleza de diversos péptidos antigénicos unidos a moléculas del MHC. Véase Chiczy, R. y otros, Immunology Today (1994) 15(4): 155-160.

Sería así deseable tener moléculas del MHC que contuvieran un péptido antigénico para la modulación de la actividad de un receptor de células T. También sería deseable tener un medio para la preparación de moléculas del MHC virtualmente con cualquier péptido deseado situado en una ranura de unión para la interacción con un receptor de células T. Sería además deseable tener un medio para identificar péptidos que fueran capaces de modular la actividad de un receptor de células T.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un complejo de fusión del MHC, un constructo de DNA, un vector, un uso y una composición farmacéutica como los definidos en las reivindicaciones adjuntas.

Los complejos de fusión del MHC pueden comprender un péptido de presentación conectado covalentemente a la molécula del MHC que contiene una ranura o hendidura de unión a péptidos. Según se usa aquí, el término “péptido de presentación” se refiere a un péptido que es capaz de modular la actividad de un receptor de células T, para inducir la proliferación de células T o para inhibir o inactivar el desarrollo de células T, según se determina por los ensayos descritos posteriormente, incluyendo el ensayo que incluye etapas secuenciales de cultivar células T para hacer proliferar las mismas, y poner en contacto las células T con un complejo de fusión del MHC de la invención y a continuación evaluar si el complejo de fusión del MHC inhibe el desarrollo adicional de las células T.

Conectar covalentemente el péptido de presentación al péptido del MHC de acuerdo con la invención proporciona un número de ventajas significativas. La práctica actual requiere la purificación de moléculas del MHC que se han cargado previamente con péptidos de células que presentan antígenos. Los péptidos cargados están estrechamente unidos y no pueden intercambiarse eficazmente con el péptido de interés. Pueden producirse complejos de fusión del MHC de la invención que contienen un solo péptido antigénico, incluyendo tal péptido de estructura conocida. El análisis de interacciones con receptores de células T se facilitará mediante el uso de tales moléculas del MHC. Adicionalmente, puede presentarse una amplia variedad de péptidos para la interacción con células T en virtud del hecho de que sólo un pequeño número (alrededor de 4 a 6) de los aminoácidos en el péptido de presentación es importante para unirse a una molécula del MHC particular, esto es, una biblioteca de diferentes péptidos limitada solamente por los residuos de anclaje del MHC puede conectarse covalentemente a la molécula del MHC para la presentación de células T. Además, para aplicaciones terapéuticas, en lugar de la administración de una molécula del MHC a un sujeto, puede administrarse un vector de expresión de DNA que codifica para la molécula del MHC conectada al péptido de presentación, para la expresión *in vivo* del complejo de fusión del MHC. Tal sistema evita etapas de purificación costosas típicamente asociadas con la preparación de proteínas recombinantes y evita las complejidades de la captación y el procesamiento de antígenos asociadas con sistemas convencionales.

La molécula del MHC de los complejos de fusión puede ser MHC clase II. Para un complejo de fusión del MHC que contiene una molécula del MHC de clase II, preferiblemente, el péptido de presentación está conectado covalentemente al extremo N de la cadena  $\beta$  de la proteína del MHC, aunque el péptido de presentación también puede estar conectado a la cadena  $\alpha$  de la proteína del MHC.

Los complejos de fusión del MHC pueden estar truncados (particularmente, no incluyendo una porción de transmembrana) o pueden ser “de longitud completa” e incluir una porción de transmembrana y/o un dominio citoplásmico y/u otras membranas celulares. Según se analiza posteriormente, para algunos sistemas, puede emplearse adecuadamente un complejo de fusión del MHC que no incluye una porción de transmembrana, mientras que para otras aplicaciones puede emplearse un complejo de fusión del MHC que contiene una porción de transmembrana y/o una porción citoplásmica y/o tales otros dominios.

Los complejos de fusión del MHC también pueden incluir preferiblemente una secuencia conectora flexible interpuesta entre la proteína del MHC y el péptido de presentación. La secuencia conectora debe permitir la colocación eficaz del péptido de presentación con respecto a la ranura de unión de la molécula del MHC de modo que el péptido de presentación pueda modular la actividad de un receptor de células T, para inducir la proliferación de células T o para inhibir o inactivar el desarrollo de células T, según se determina por los ensayos descritos posteriormente, incluyendo los ensayos *in vitro* que incluyen etapas secuenciales de cultivar células T para hacer proliferar las mismas, y poner en contacto las células T con un complejo de fusión del MHC de la invención y a continuación evaluar si el complejo de fusión del MHC inhibe el desarrollo adicional de las células T.

En un aspecto preferido de la invención, un complejo de fusión del MHC sin una porción de transmembrana (es decir, un “complejo truncado”) está conectado covalentemente a una inmunoglobulina tal como IgG, IgM o IgA o un fragmento de la misma (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>). Adecuadamente, el complejo de fusión del MHC está conectado a regiones constantes de la inmunoglobulina. Tal conexión a una inmunoglobulina puede proporcionar un número de ventajas sobre la expresión del complejo de fusión del MHC incluyendo una estabilidad incrementada, fácil purificación por afinidad y flexibilidad en el número de dominios de unión presentados, por ejemplo, desde un dominio en fragmentos similares a Fab hasta dominios multivalentes en moléculas de IgG o similares a IgM.

Un complejo de fusión del MHC puede ser una proteína de fusión monocaténaria, es decir, un complejo del MHC de clase II, donde las subunidades de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  están conectadas como una proteína de fusión monocaténaria. El péptido de presentación está preferiblemente conectado a la cadena  $\beta$  de la proteína de fusión. Tal complejo

monocatenario conectado puede proporcionar un número de ventajas. En particular, al reducir el complejo a una sola molécula, pueden mejorarse los rendimientos y la estabilidad de las moléculas. Eso puede ser especialmente importante para moléculas solubles que no pueden producirse eficazmente en forma activa. Los complejos de fusión del MHC monocatenarios de la invención son útiles para los métodos descritos aquí, incluyendo la identificación *in vitro* de péptidos reconocidos por un receptor de células T, métodos para suprimir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, el tratamiento de individuos con trastornos inmunitarios tales como trastornos autoinmunitarios o alergias) y métodos para inducir una respuesta inmunitaria deseada, y métodos de diagnóstico tales como tipaje del HLA y obtención de imágenes de diagnóstico *in vivo*. También se prefiere la administración directa de una construcción de DNA que codifica para una molécula (complejo) de fusión del MHC monocatenaria.

La invención también describe métodos para la identificación *in vitro* de péptidos reconocidos por un receptor de células T, incluyendo péptidos que pueden inducir el desarrollo de células T así como péptidos que pueden antagonizar receptores de células T, es decir antagonistas o agonistas parciales de receptores de células T (TcR).

Además, se describen métodos para suprimir una respuesta inmunitaria de un mamífero, particularmente un ser humano, que comprenden administrar al mamífero una cantidad eficaz de un complejo de fusión del MHC de la invención. Esos métodos incluyen el tratamiento de un mamífero que sufre o es susceptible a un trastorno autoinmunitario tal como esclerosis múltiple, diabetes mellitus insulino dependiente o artritis reumatoide, o, alternativamente, un mamífero que es susceptible a una respuesta o respuestas inmunitarias no deseadas, tales como un sujeto con alergias crónicas o un paciente que sufre cirugía de trasplante tal como cirugía de trasplante de órganos o piel.

Una respuesta inmunitaria puede suprimirse de acuerdo con la invención mediante una o una combinación de estrategias alternativas. Así, un método de tratamiento para la supresión de una respuesta inmunitaria induciendo anergia o apoptosis de células T específicas y proporciona la administración de una cantidad eficaz de uno o más complejos de fusión del MHC puede estar en ausencia sustancial de señal o señales co-estimulantes. Típicamente, se emplea un complejo de fusión del MHC truncado, es decir un complejo de fusión del MHC soluble que no contiene dominios de transmembrana y citoplásmico de una molécula del MHC de longitud completa o intacta. Otro método para la supresión de una respuesta inmunitaria proporciona la administración de una cantidad eficaz de uno o más complejos de fusión del MHC de la invención que contienen cada uno un péptido de presentación conectado covalentemente que es un antagonista o un agonista parcial de células T.

El complejo de fusión del MHC que contiene el péptido de presentación que es un antagonista o un agonista parcial de células T puede administrarse como un complejo de fusión del MHC soluble que carece de señales co-estimulantes. Alternativamente, la administración puede tomar la forma de una cantidad eficaz de una secuencia de DNA que comprende un vector que codifica para un complejo de fusión del MHC “de longitud completa”, es decir, un complejo que contiene proteínas del MHC de longitud completa incluyendo la porción de transmembrana y un péptido de presentación con actividad antagonista o agonista parcial conectado covalentemente a la molécula del MHC.

En un aspecto adicional, la invención proporciona métodos para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero, que, en general, comprenden la administración de una cantidad eficaz de una secuencia de DNA que comprende un vector que codifica para un complejo de fusión del MHC “de longitud completa” de la invención, es decir un complejo que contiene proteínas del MHC de longitud completa incluyendo la porción de transmembrana y un péptido de presentación conectado covalentemente a la molécula del MHC. Preferiblemente, se administra a un mamífero DNA que codifica para un complejo de fusión del MHC de longitud completa de la invención, junto con una secuencia de DNA que codifica para un factor coestimulante de células T tal como un gen que codifica para B7 o B7-2. Según se usa aquí, el término “factor co-estimulante de células T” se refiere a un péptido que es capaz de proporcionar una señal co-estimulante para activar de ese modo la proliferación de células T en presencia de uno o más complejos de fusión del MHC de la invención. Tal activación de la proliferación de células T puede determinarse mediante los ensayos descritos aquí, incluyendo el ensayo que se ejemplifica en el Ejemplo 9 y se analiza posteriormente. También se proporcionan métodos de diagnóstico incluyendo tipaje del HLA y obtención de imágenes de diagnóstico *in vivo* usando complejos de fusión del MHC de la invención, incluyendo complejos de fusión del MHC que contienen un marcador radiactivo (por ejemplo,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$  o  $^{99}\text{Tc}$ ) u otra etiqueta detectable.

Otros aspectos de la invención se analizan posteriormente.

## Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y 1B representan cada una un complejo de fusión del MHC de la invención que incluye una secuencia conectora. La figura 1C muestra esquemáticamente un complejo de fusión del MHC de la invención conectado o fusionado a una inmunoglobulina.

La figura 2 muestra el esquema para aislar el fragmento génico  $\alpha 1\text{-}\alpha 2$  de I-A<sup>d</sup> y la clonación del mismo. La figura 8 especifica los cebadores oligonucleotídicos usados en el procedimiento representado.

La figura 3 muestra el esquema para aislar el fragmento génico  $\beta 1\text{-}\beta 2$  de I-A<sup>d</sup>, enlazar la secuencia conectora e insertar los oligonucleótidos que codifican los péptidos antigénicos. La figura 8 especifica los cebadores oligonucleotídicos usados en el procedimiento representado.

## ES 2 152 424 T5

La figura 4 muestra el esquema de clonación para  $\alpha 1-\alpha 2$  de HLA-DR1 humano. La figura 8 especifica los cebadores oligonucleotídicos usados en el procedimiento representado.

5 La figura 5 muestra el esquema de clonación para la cadena  $\beta 1-\beta 2$  de HLA-DR1 humano. La figura 8 especifica los cebadores oligonucleotídicos usados en el procedimiento representado.

La figura 6 muestra el esquema para aislar el fragmento génico  $\alpha 1-\alpha 2$  de I-A<sup>s</sup> y la clonación del mismo. La figura 8 especifica los cebadores oligonucleotídicos usados en el procedimiento representado.

10 La figura 7 muestra el esquema para aislar el fragmento génico  $\beta 1-\beta 2$  de I-A<sup>s</sup>, enlazar la secuencia conectora e insertar los oligonucleótidos que codifican los péptidos antigénicos. La figura 8 especifica los cebadores oligonucleotídicos usados en el procedimiento representado.

15 La figura 8 (ID SEC N°: 26-74) muestra las secuencias de oligonucleótidos usadas para construir complejos de fusión del MHC de la invención.

La figura 9 (que incluye las figuras 9A-9F) (ID SEC N°: 75-98) muestra secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de complejos de fusión del MHC solubles de la invención.

20 Las figuras 10A y 10B muestran vectores de expresión de células de mamífero usados en el Ejemplo 2 que sigue.

Las figuras 11A y 11B muestran construcciones de DNA de la invención que se describen en el Ejemplo 2 que sigue. En las figuras 11A y 11B (y las figuras 15, 16A y 16B) la referencia "PE" indica promotor y estimulador, la referencia "LS" indica exón de la secuencia líder y la referencia "HC" indica cadena pesada.

25 La figura 12 muestra el esquema para introducir sitios de restricción en el inserto de 2,7 kb de la cadena kappa a través de mutagénesis dirigida al sitio por PCR.

30 La figura 13 muestra el esquema para construir un gen de fusión que codifica el MHC (clase II $\alpha$ )/la región constante de la cadena kappa en un vector de expresión de células de mamífero.

La figura 14 (ID SEC N°: 99-102) muestra cebadores usados para someter a secuenciación el fragmento de 2,7 kb mutado.

35 La figura 15 muestra el esquema para la mutagénesis M13 y la clonación del gen variable  $\beta$  del MHC II.

Las figuras 16A y 16B muestran vectores de la invención para la expresión de proteínas quiméricas de MHC II/Ig.

40 La figura 17 muestra el esquema para la construcción de un vector de expresión de complejo de fusión del MHC de longitud completa de la invención.

Las figuras 18A y 18B (ID SEC N°: 103-109) muestran secuencias de DNA y aminoácidos de complejos de fusión del MHC de longitud completa de la invención.

45 La figura 19 (total de 7 hojas) muestra el esquema de clonación llevado a cabo en el Ejemplo 12 que sigue. La figura 20 representa cebadores oligonucleotídicos usados en el esquema de clonación representado.

50 La figura 20 (ID SEC N°: 110-112) representa secuencias de cebadores oligonucleotídicos usados para construir complejos de fusión del MHC de la invención.

55 La figura 21 muestra gráficamente la actividad funcional de los cuatro clones del Ejemplo 13 que sigue junto con un control negativo (NSO) y un control positivo (A20), donde se presenta el valor de la D.O. de las cuatro primeras diluciones del sobrenadante de cultivo de DO11.10.

La figura 22 muestra gráficamente los resultados del ensayo de proliferación de células T del Ejemplo 15 que sigue.

La figura 23 muestra gráficamente los resultados del ensayo de proliferación de células T del Ejemplo 16 que sigue.

60 La figura 24 representa un complejo de fusión del MHC monocatenario de la invención.

La figura 25 (total de 3 hojas) muestra el esquema de clonación llevado a cabo en el Ejemplo 17 que sigue.

65 La figura 26 (ID SEC N°: 113-120) representa secuencias de cebadores oligonucleotídicos usados para construir complejos de fusión del MHC de la invención.

La figura 27 (ID SEC N°: 121) muestra las secuencias de DNA y aminoácidos del gen monocatenario SSC1.

La figura 28 (ID SEC N°: 122) muestra las secuencias de DNA y aminoácidos del gen monocatenario SCT1.

La figura 29 (ID SEC N°: 123) muestra las secuencias de DNA y aminoácidos del gen monocatenario SCE1.

## 5 Descripción detallada de la invención

Se han descubierto ahora nuevos complejos de fusión del MHC, y vectores de expresión que codifican tales complejos, que comprenden una molécula del MHC conectada covalentemente a un péptido de presentación, y métodos para el uso de tales complejos de fusión y vectores de expresión, según se define en las reivindicaciones adjuntas.

En general, la preparación de complejos de fusión del MHC puede efectuarse mediante procedimientos descritos aquí y mediante técnicas de DNA recombinante reconocidas, por ejemplo preparación de DNA plasmídico, segmentación de DNA con enzimas de restricción, ligación de DNA, transformación o transfección de un huésped, cultivo del huésped y aislamiento y purificación del complejo de fusión expresado. Tales procedimientos son generalmente conocidos y se describen, por ejemplo, en Sambrook y otros, *Molecular Cloning* (2ª ed. 1989).

Más específicamente, se obtiene DNA que codifica para una proteína del MHC deseada a partir de una línea celular adecuada según se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 1 que sigue. Se conocen otras fuentes de DNA que codifican para la proteína del MHC, por ejemplo, células linfoblastoides humanas. Una vez aislado, el gen que codifica para la molécula del MHC puede amplificarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros medios conocidos en la técnica. Cebadores de PCR adecuados para amplificar el gen del péptido del MHC pueden añadir sitios de restricción al producto de PCR. Por ejemplo, para la expresión de un complejo de fusión truncado, específicamente un complejo de fusión del MHC soluble que no contiene porciones de transmembrana o citoplásmicas y está conectado a una inmunoglobulina tal como IgG, el producto de PCR incluye preferiblemente sitios de corte y empalme de IgG y secuencias líder necesarias para la expresión y la secreción apropiadas del complejo de fusión de MHC-inmunoglobulina. El producto de PCR también incluye preferiblemente una secuencia que codifica para la secuencia conectora, o un sitio de enzima de restricción para la ligación de tal secuencia. Cebadores, condiciones de PCR y técnicas de construcción de vectores de expresión adecuados se describen, por ejemplo, en los ejemplos que siguen y en los dibujos.

La secuencia conectora es preferiblemente una secuencia nucleotídica que codifica para un péptido que puede situar eficazmente el péptido de presentación en la ranura de unión de la molécula del MHC. Según se usa aquí, la expresión “el péptido de presentación está situado eficazmente en la ranura de unión de una molécula del MHC” o “complejo de fusión del MHC capaz de modular la actividad de una célula T”, u otra expresión similar, pretende significar que el péptido de presentación conectado a una proteína del MHC está situado de modo que el péptido de presentación y el complejo de fusión son capaces de modular la actividad de un receptor de células T, para inducir la proliferación de células T o para inhibir o inactivar el desarrollo de células T, según se determina por un ensayo descrito posteriormente, incluyendo el ensayo que incluye etapas secuenciales de cultivar células T para hacer proliferar las mismas, y poner en contacto las células T con un complejo de fusión del MHC de la invención y a continuación evaluar si el complejo de fusión del MHC inhibe el desarrollo adicional de las células T.

Preferiblemente, la secuencia conectora comprende de aproximadamente 7 a 20 aminoácidos, más preferiblemente de aproximadamente 8 a 16 aminoácidos, aún más preferiblemente de aproximadamente 8 a 12 aminoácidos. La secuencia conectora es preferiblemente flexible a fin de no plegar el péptido de presentación en una conformación simple no deseada. El conector, preferiblemente, comprende predominantemente aminoácidos con cadenas laterales pequeñas, tales como glicina, alanina y serina, para proporcionar flexibilidad. Preferiblemente, aproximadamente 80 ó 90 por ciento o más de la secuencia conectora comprende residuos de glicina, alanina o serina, particularmente residuos de glicina y serina. Preferiblemente, la secuencia conectora no contiene ningún residuo de prolina, que podría inhibir la flexibilidad. Para un complejo de fusión del MHC que contiene una molécula del MHC clase II, la secuencia conectora está adecuadamente conectada a la cadena  $\beta$  de la molécula del MHC, aunque la secuencia conectora también podría estar enlazada a la cadena  $\alpha$  de la molécula del MHC. Para conectar covalentemente un péptido de presentación a una molécula de la cadena  $\beta$  del MHC clase II, la aminosecuencia del conector debe ser capaz de extenderse aproximadamente 30 angstroms desde el residuo N-terminal de la cadena  $\beta$  del MHC clase II hasta el residuo C-terminal del péptido de presentación. Véanse, por ejemplo, las figuras 1A y 1B de los dibujos. Cuando tal cadena peptídica  $\beta$  se expresa junto con la cadena  $\alpha$ , el péptido de presentación conectado debe plegarse en la ranura de unión de  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  dando como resultado una molécula del MHC funcional como la representada generalmente en la figura 1C. Una secuencia conectora adecuada es ASGGGGSGGG (ID SEC N°: 1) (es decir, Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly), preferiblemente conectada al primer aminoácido del dominio  $\beta 1$  de la proteína del MHC clase II. Podrían usarse diferentes secuencias conectoras incluyendo cualquiera de un número de diseños de conector flexibles que se han usado satisfactoriamente para empalmar entre sí regiones variables de anticuerpos, véase Whitlow, M. y otros (1991) *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97-105. Las secuencias conectoras adecuadas pueden identificarse fácilmente empíricamente. Por ejemplo, una construcción de DNA que codifica para un complejo de fusión del MHC que incluye una secuencia conectora puede clonarse y expresarse, y el complejo de fusión probarse para determinar si el complejo es capaz de modular la actividad de un receptor de células T, para inducir la proliferación de células T o para inhibir o inactivar el desarrollo de células T, según se determina mediante el ensayo descrito posteriormente. El tamaño y las secuencias adecuadas de las secuencias conectoras también pueden determinarse mediante técnicas de modelado computarizadas basadas en el tamaño y la conformación predichos de la molécula del MHC.

Preferiblemente, los sitios de restricción se tratan mediante ingeniería en la construcción de DNA que comprende las secuencias nucleotídicas fusionadas que codifican para la secuencia conectora y la proteína del MHC, de modo que esencialmente cualquier secuencia nucleotídica que codifique para un péptido de presentación de interés (por ejemplo, un péptido de presentación antigénico o antagonista) puede enlazarse a la construcción. Por ejemplo, en un sistema preferido ejemplificado en los ejemplos que siguen, se incluyen sitios de restricción adecuados (por ejemplo sitios *Afl*II y *Nhe*I) entre el extremo de la secuencia líder y el principio del conector para facilitar la inserción de una amplia variedad de péptidos de presentación en el gen de la cadena  $\beta$  de la molécula del MHC. Véase, por ejemplo, la figura 3 de los dibujos. Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de secuencias líder específicamente preferidas se representan en las figuras 18A y 18B de los dibujos.

El componente del péptido de presentación de un complejo de fusión del MHC debe ser capaz de modular la actividad de una célula T según se describe anteriormente. Para un complejo de fusión del MHC que contiene una molécula del MHC de clase II, preferiblemente, el péptido de presentación tiene de aproximadamente 4 a 35 aminoácidos, más preferiblemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 30 aminoácidos, aún más preferiblemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 25 aminoácidos. Las moléculas del MHC de clase I y clase II muestran una unión preferente hacia diferentes secuencias peptídicas. Recientemente, se han identificado residuos de anclaje que definen motivos peptídicos específicos para el alelo del MHC en péptidos que se unen a la clase II [Sinigaglia, F. y otros (1994) *Curr. Opin. in Immun.* 6:52-56]. Por ejemplo, en moléculas de HLA-DR1 de clase II humanas, se encuentra habitualmente un aminoácido aromático (por ejemplo, Tyr, Phe o Trp) cerca del extremo amino del péptido (posición 1), un residuo hidrófobo (por ejemplo, Met o Leu) en la posición 4 y un aminoácido pequeño (por ejemplo, Ala o Gly) en la posición 6. Otras moléculas del MHC tienen motivos diferentes, por ejemplo, para las moléculas de la clase II, véase Sinigaglia, anteriormente; para las moléculas de clase I, véase Parker, K.C. y otros (1994) *J. Immunol.* 152:163-175. Péptidos de presentación preferidos incluyen el motivo de unión a MHC deseado para facilitar la unión óptima al MHC. Así, por ejemplo, en moléculas del MHC HLA-DR1 de clase II humanas, un aminoácido aromático (por ejemplo, Tyr, Phe o Trp) se sitúa preferiblemente cerca del extremo amino del péptido de presentación (posición 1), un residuo hidrófobo (por ejemplo, Met o Leu) está en la posición 4 del péptido de presentación y un aminoácido pequeño (por ejemplo, Ala o Gly) está en la posición 6 del péptido de presentación. Para los métodos de inmunosupresión de la invención (por ejemplo, para tratar enfermedades autoinmunes o alergias, o suprimir de otra manera una respuesta de células T no deseada), el péptido de presentación preferiblemente puede ser el mismo que u homólogo a (por ejemplo, al menos más de aproximadamente 80 ó 90% de secuencia compartida) un péptido que se sabe o se sospecha que es responsable de activar células T en el trastorno elegido. Así, por ejemplo, el péptido MPB 80-105 es reconocido por más de 30% de células T específicas de MPB aisladas de pacientes con esclerosis múltiple [véase E. Meinel y otros, *J. Clin. Invest.* 92: 2533-2643 (1993)] y debe ser adecuado como un péptido de presentación en complejos de fusión del MHC usados para aplicaciones de inmunosupresión según se describe aquí. Adicionalmente, la actividad de un péptido de presentación particular, es decir antigénica o antagonista o agonista parcial, puede determinarse fácilmente empíricamente mediante los métodos descritos aquí, incluyendo los ensayos *in vivo* descritos posteriormente.

Para elaborar el vector que codifica para un complejo de fusión del MHC, la secuencia que codifica para la molécula del MHC se conecta a una secuencia que codifica para el péptido de presentación mediante el uso de ligasas adecuadas. El DNA que codifica para el péptido de presentación puede obtenerse aislando DNA de fuentes naturales o mediante métodos sintéticos conocidos, por ejemplo el método del triéster de fosfato. Véase, por ejemplo, *Oligonucleotide Synthesis*, IRL Press (M.J. Gait, ed., 1984). Los oligonucleótidos sintéticos también pueden prepararse usando sintetizadores de oligonucleótidos automatizados disponibles comercialmente. Una secuencia nucleotídica que codifica para una molécula del MHC puede empalmarse directamente a una secuencia de DNA que codifica para el péptido de presentación o, más típicamente, una secuencia de DNA que codifica para la secuencia conectora, según se describe anteriormente, puede interponerse entre la secuencia que codifica para la molécula del MHC y la secuencia que codifica para el péptido de presentación y empalmarse usando ligasas adecuadas.

También pueden incluirse otras secuencias nucleotídicas en la construcción génica. Por ejemplo, una secuencia promotora, que controla la expresión de la secuencia que codifica para el péptido del MHC fusionado al péptido de presentación, o una secuencia líder, que dirige el complejo de fusión del MHC a la superficie celular o al medio de cultivo, pueden incluirse en la construcción o estar presentes en el vector de expresión en el que se inserta la construcción. Se prefiere particularmente una inmunoglobulina o un promotor de CMV se prefiere particularmente. Véanse los ejemplos que siguen. También puede incluirse una secuencia de iniciación de la traducción fuerte en la construcción para mejorar la eficacia de la iniciación de la traducción. Una secuencia de iniciación preferida es la secuencia de consenso Kozak (CCACCATG) (ID SEC N°: 2). Véanse también las figuras 18A y 18B de los dibujos.

Preferiblemente, una secuencia líder incluida en una construcción de DNA de la invención contiene un sitio de restricción situado eficazmente de modo que un oligonucleótido que codifica un péptido de presentación de interés puede enlazarse a la molécula del MHC. Adecuadamente, el sitio de restricción puede incorporarse en el extremo 3 de la secuencia líder, a veces denominada aquí una secuencia de juntura, por ejemplo de aproximadamente 2 a 10 codones de longitud, que está situada antes de la región de codificación para el péptido de presentación. Un sitio de restricción particularmente preferido es el sitio *Afl*II, aunque también pueden incorporarse otros sitios de segmentación antes de la región de codificación del péptido de presentación. Según se analiza anteriormente, el uso de tal sitio de restricción en combinación con un segundo sitio de restricción, típicamente situado al principio de la secuencia que codifica para el conector, permite la inserción rápida y directa de secuencias que codifican para una amplia variedad

de péptidos de presentación en la construcción de DNA para el complejo de fusión del MHC. Las secuencias líder preferidas contienen un sitio de iniciación de la traducción fuerte y un sitio de protección en el extremo 3' de su mRNA. Preferiblemente, una secuencia líder está enlazada al dominio  $\beta$  de una molécula del MHC de clase II. Las secuencias líder preferidas proporcionan la expresión secretora del complejo de fusión del MHC.

Puede emplearse un número de estrategias para expresar complejos de fusión del MHC. Por ejemplo, la construcción de fusión génica del MHC descrita anteriormente puede incorporarse en un vector adecuado por medios conocidos tales como mediante el uso de enzimas de restricción para realizar cortes en el vector para la inserción de la construcción seguida por ligación. El vector que contiene la construcción génica se introduce a continuación en un huésped adecuado para la expresión del péptido o complejo de fusión del MHC. Véase, generalmente, Sambrook y otros, anteriormente. La selección de vectores adecuados puede realizarse empíricamente basándose en factores que se refieren al procedimiento de clonación. Por ejemplo, el vector debe ser compatible con, y tener el replicón apropiado para, el huésped que se está empleando. Además, el vector debe ser capaz de alojar la secuencia de DNA que codifica para el complejo de fusión del MHC que ha de expresarse. Células huésped adecuadas incluyen células eucarióticas y procarióticas, preferiblemente aquellas células que pueden transformarse fácilmente y exhibir rendimiento rápido en el medio de cultivo. Células huésped específicamente preferidas incluyen procariotas tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, etc. y eucariotas tales como células animales y cepas de levadura, por ejemplo, *S. cerevisiae*. Se prefieren generalmente células de mamífero, particularmente J558, NSO, SP2-O o CHO. Otros huéspedes adecuados incluyen, por ejemplo, células de insecto tales como Sf9. Se emplean condiciones de cultivo convencionales. Véase Sambrook, anteriormente. Pueden seleccionarse a continuación líneas celulares transformadas o transfectadas estables. Las células que expresan un complejo de fusión del MHC de la invención pueden determinarse mediante procedimientos conocidos. Por ejemplo, la expresión de un complejo de fusión del MHC conectado a una inmunoglobulina puede determinarse mediante un ELISA específico para la inmunoglobulina conectada y/o mediante inmunotransferencia.

En un procedimiento preferido para la preparación de complejos de fusión del MHC solubles, secuencias de DNA que codifican el péptido de presentación y dominios  $\beta 1$ - $\beta 2$  de la molécula del MHC (clase II) se disponen de modo que el extremo C-terminal del péptido de presentación está enlazado a un aminoácido inicial del dominio  $\beta 1$ , preferiblemente el primer aminoácido del dominio  $\beta 1$ , mediante una secuencia conectora flexible. Tal construcción se representa en las figuras 1A y 1B de los dibujos. Según se analiza anteriormente, preferiblemente, los sitios de restricción se tratan mediante ingeniería entre el extremo de la secuencia líder y el principio del conector de modo que esencialmente cualquier oligonucleótido que codifica un péptido de presentación de interés (es decir, antigénico o antagonista) puede ligarse al gen de la cadena  $\beta$ . Para la expresión soluble, los dominios  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  y  $\beta 1$ - $\beta 2$  conectado al péptido se fusionan adecuadamente a una inmunoglobulina, preferiblemente a los dominios constantes de las cadenas kappa y pesada de la inmunoglobulina, respectivamente, según se representa en la figura 1. Inmunoglobulinas preferidas para tal fusión a  $\alpha$  y  $\beta$  para la expresión soluble incluyen, por ejemplo, los dominios constantes de la cadena ligera y los dominios CH2-CH3 de IgG2b.

Un complejo de fusión del MHC expresado puede aislarse y purificarse mediante métodos conocidos. Típicamente, el medio de cultivo se centrifuga y a continuación el sobrenadante se purifica mediante cromatografía de afinidad o inmuoafinidad, por ejemplo cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G o un procedimiento de inmuoafinidad que comprende el uso de anticuerpos monoclonales que se unen al complejo de fusión expresado tal como un MHC conectado o una región de inmunoglobulina del mismo. Por ejemplo, los complejos de fusión del MHC que contienen secuencias de HLA-DR1 humano pueden purificarse mediante cromatografía de afinidad sobre una columna de anticuerpo monoclonal L243-Sepharose mediante procedimientos que se conocen y se describen generalmente, por ejemplo, véase Harlow, E. y otros, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988). El anticuerpo monoclonal L243 es específico para un epitopo conformacional de la molécula de HLA-DR1 plegada apropiadamente [George, J.C. y otros (1992) *J. Biol. Chem.* 262:16087-16094], y por lo tanto se prepararía para purificar el complejo de fusión del MHC biológicamente activo. El complejo de fusión del MHC también puede contener una secuencia para ayudar a la purificación; véase, por ejemplo, el Ejemplo 17 que sigue, que describe el uso de una etiqueta 6xHis.

Los complejos de fusión del MHC truncados de la invención contienen una molécula del MHC que está suficientemente truncada para que el complejo de fusión del MHC pueda secretarse en un medio de cultivo (por ejemplo, condiciones fisiológicas; en ausencia sustancial o completa de detergente o similares) después de la expresión. Así, un complejo de fusión del MHC truncado no incluirá regiones ricas en residuos hidrófobos, típicamente los dominios de transmembrana y citoplásmico de la molécula del MHC, aunque al menos porciones de esos dominios pueden estar presentes adecuadamente con tal de que la molécula del MHC pueda secretarse como se analiza. Así, por ejemplo, para una molécula del MHC DR1 truncada preferida de la invención, preferiblemente de aproximadamente los residuos 199 a 237 de la cadena  $\beta$  y de aproximadamente los residuos 193 a 230 de la cadena  $\alpha$  de la molécula del MHC no se incluyen en el complejo de fusión del MHC truncado. Véanse los ejemplos que siguen. Además de las secuencias descritas aquí, las secuencias de los dominios de moléculas del MHC clase I y clase II se han descrito previamente (véanse, por ejemplo, las publicaciones mencionadas anteriormente). Los complejos de fusión del MHC truncados de la invención, por supuesto, también pueden identificarse empíricamente, es decir examinando si el complejo del MHC se secreta en medio de cultivo después de la expresión como se analiza. Los complejos de fusión del MHC truncados pueden prepararse mediante varios medios, por ejemplo la expresión de una molécula del MHC soluble o la segmentación enzimática (por ejemplo, papaína) de al menos porciones de dominios de transmembrana y/o citoplásmico de un complejo de fusión del MHC de longitud completa.

Las moléculas del MHC de longitud completa incluyen una porción de transmembrana y/o un dominio citoplásmico y/u otras membranas celulares o porciones sustanciales de las mismas (por ejemplo, más de aproximadamente 80 ó 90 por ciento de tales secuencias). Para una molécula del MHC clase II de longitud completa de la invención, generalmente tanto las cadenas  $\alpha$  como  $\beta$  están conectadas a dominios de transmembrana y citoplásmicos, aunque sólo una de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  puede estar conectada a dominios de transmembrana y citoplásmico, particularmente en el caso de moléculas del MHC monocatenarias de la invención. Según se analiza anteriormente, las moléculas del MHC de longitud completa pueden anclarse a membranas celulares a través de dominios hidrófobos que se extienden a través de la membrana o alternativamente a través de la unión post-traslacional de otros dominios de anclaje tales como una forma glicosilada conectada covalentemente de fosfatidilinositol.

Según se analiza anteriormente, los complejos de fusión del MHC monocatenarios son complejos de fusión que consisten en un solo polipéptido en vez de un agregado de múltiples cadenas, tal como el complejo de clase II heterotrímera natural/péptido en el que las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  y un péptido están asociados a través de interacciones no covalentes. En el caso de un complejo del MHC clase II monocatenario, las subunidades de la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  están conectadas como una proteína de fusión monocatenaria con el péptido de presentación preferiblemente conectado a la cadena  $\beta$  de la proteína de fusión de cadenas. Tal molécula del MHC monocatenaria preferida se representa en la figura 24. Preferiblemente, se usa una secuencia conectora para conectar las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . Tal secuencia conectora usada para conectar dominios de una molécula del MHC se denomina a veces aquí una “secuencia conectora de cadenas sencillas” y se distingue de ese modo de la secuencia conectora tratada anteriormente que está interpuesta entre y conecta covalentemente un péptido de presentación y una molécula del MHC.

Preferiblemente, un complejo del MHC clase II monocatenario de la invención está conectado entre el extremo carboxilo del dominio  $\beta 2$  y el extremo amino del dominio  $\alpha 1$ , aunque múltiples dominios de un complejo del MHC de la invención pueden estar conectados a través de otras posiciones.

La secuencia conectora de cadenas sencillas debe permitir que la molécula del MHC conectada se pliegue hasta una forma activa, es decir, una forma en la que la molécula del MHC pueda modular la actividad de una célula T. Tales secuencias conectoras de cadenas sencillas eficaces pueden determinarse fácilmente empíricamente. Así, por ejemplo, una construcción de DNA que codifica para una molécula del MHC monocatenaria de la invención, donde las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  están conectadas por una secuencia conectora, puede clonarse y expresarse, y la molécula del MHC monocatenaria probarse para determinar si el complejo es capaz de modular la actividad de un receptor de células T, para inducir la proliferación de células T o para inhibir el desarrollo de células T, según se determina por los ensayos descritos posteriormente.

Tanto la longitud como la composición de la secuencia conectora de cadenas sencillas pueden variar en general. Por ejemplo, la longitud de una secuencia conectora de cadenas sencillas adecuada puede variar con las posiciones en las que la secuencia conectora está conectada a cadenas polipeptídicas del complejo del MHC; en otras palabras, la longitud de la secuencia conectora puede variar con la geometría del “espacio” entre polipéptidos que salva la secuencia conectora.

La secuencia conectora de cadenas sencillas preferiblemente también debe ser flexible para permitir el pliegue de la molécula monocatenaria hasta una forma activa. La secuencia conectora comprende así predominantemente de forma preferible aminoácidos con cadenas laterales pequeñas, tales como glicina, alanina y serina, para proporcionar flexibilidad. Preferiblemente, aproximadamente 80 ó 90 por ciento o más de la secuencia conectora comprende residuos de glicina, alanina o serina, particularmente residuos de glicina y serina. Preferiblemente, esta secuencia conectora entre las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  no contiene ningún residuo de prolina, que podría inhibir la flexibilidad. Preferiblemente, una secuencia conectora situada entre el extremo carboxilo de un dominio  $\beta 2$  y el extremo amino del dominio  $\alpha 1$  comprenderá aproximadamente de 15 a 40 aminoácidos, más preferiblemente aproximadamente de 15 a 30 aminoácidos. Una secuencia conectora particularmente preferida se describe en el Ejemplo 17 que sigue. El tamaño y la secuencia adecuados de las secuencias conectoras de cadenas sencillas también pueden determinarse mediante técnicas computarizadas convencionales; véase el Ejemplo 17 que sigue.

Los complejos del MHC monocatenarios pueden prepararse según se analiza anteriormente así como en los ejemplos que siguen, incluyendo los Ejemplos 17-19. Por ejemplo, DNA que codifica una proteína del MHC deseada puede obtenerse a partir de una línea celular adecuada, y el gen aislado puede amplificarse mediante PCR u otros medios. En el caso de una molécula de clase II del MHC de la invención, un fragmento génico  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  puede clonarse en un vector, seguido por la clonación de un fragmento génico que codifica para los dominios  $\beta 1$ - $\beta 2$  con una secuencia conectora de cadenas sencillas interpuesta. El vector simple se expresa a continuación en un huésped adecuado y la molécula monocatenaria se recoge y se purifica si se desea. Véanse los ejemplos que siguen, incluyendo los Ejemplos 17-19. Véase también la Patente de EE.UU. 5.260.203 de Ladner y otros, que analiza la preparación de anticuerpos monocatenarios, métodos que pueden emplearse generalmente para los complejos de fusión del MHC monocatenarios de la invención.

En un método de preparación preferido, se obtienen regiones de codificación de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de las moléculas del MHC clase II, particularmente aislando las regiones de codificación mediante PCR de una línea de células B u otra fuente de moléculas del MHC. Una secuencia que codifica una molécula de fusión del MHC de fusión de cadenas sencillas  $\beta$ - $\alpha$  de la invención puede construirse reemplazando secuencias que codifican el dominio que abarca la transmembrana del gen de la cadena  $\beta$  por una secuencia conectora monocatenaria como la analizada anteriormente

que empalma el gen de la cadena  $\beta$  a la cadena  $\alpha$  madura (particularmente en el primer codón del gen de la cadena  $\beta$ ). El gen de la cadena  $\alpha$  puede contener adecuadamente su región de transmembrana para la expresión unida a la membrana del complejo de fusión monocatenario, o el gen de la cadena  $\alpha$  puede estar truncado en el extremo de la región extracelular para la expresión soluble del complejo de fusión del MHC monocatenario. Un sitio de restricción y un conector adecuados para el péptido de presentación se incluyen preferiblemente entre el líder de la cadena  $\beta$  y el primer codón de la cadena  $\beta$ . La región de codificación esencialmente de cualquier péptido de presentación puede introducirse a continuación como un oligonucleótido en el sitio de restricción creado. La construcción resultante se coloca a continuación adecuadamente bajo el control de promotores de mamífero o bacteria, incluyendo los promotores específicos descritos allí. Una de tales construcciones monocatenarias del MHC clase II de la invención contiene secuencias nucleotídicas conectadas que codifican en secuencia: líder de la cadena  $\beta$ /péptido de presentación/secuencia conectora/región extracelular  $\beta$ 1- $\beta$ 2/secuencia conectora monocatenaria/región extracelular  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2. Las construcciones de DNA monocatenarias del MHC de la invención se introducen adecuadamente en sistemas de expresión de bacterias, de células de insecto baculoviral y de mamífero, incluyendo los sistemas de expresión específicos descritos aquí, a continuación se expresan y se purifican si se desea.

La molécula del MHC monocatenaria puede ser de longitud completa, es decir la molécula del MHC está asociada con dominios celulares y contiene, por ejemplo, cantidades completas o sustanciales (por ejemplo, mayores de 80% de la secuencia) de porciones de transmembrana y/o citoplásmicas de una cadena  $\alpha$  o  $\beta$ , o está truncada según se analiza anteriormente para la expresión soluble. Tales moléculas del MHC monocatenarias truncadas y de longitud completa puede producirse según se describe anteriormente y en los ejemplos para complejos del MHC polipeptídicos múltiples de la invención. Para una molécula del MHC clase II, una molécula de longitud completa puede tener sólo una de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  conectada a dominios de transmembrana y citoplásmicos, preferiblemente la cadena  $\alpha$ . Un complejo del MHC clase II de fusión monocatenario, de longitud completa comprende, conectados covalentemente en secuencia: 1) el péptido de presentación, 2) la cadena  $\beta$  de clase II que carece de dominios de transmembrana y citoplásmicos, 3) una secuencia conectora monocatenaria y 4) la cadena  $\alpha$  de clase II que contiene dominios de transmembrana y citoplásmicos o un dominio de anclaje a la membrana. Un complejo de clase II de MHC de fusión monocatenario soluble preferido comprende, conectados covalentemente en secuencia: 1) el péptido de presentación, 2) la cadena  $\beta$  de clase II que carece de dominios de transmembrana y citoplásmicos, 3) una secuencia conectora monocatenaria y 4) la cadena  $\alpha$  de clase II que carece de dominios de transmembrana y citoplásmicos.

Con respecto a los complejos del MHC de longitud completa (tanto moléculas monocatenarias como no monocatenarias), las proteínas del MHC pueden anclarse a membranas celulares a través de dominios hidrófobos que atraviesan la membrana (dominios de transmembrana) así como a través de la unión post-traslacional de la forma glicosilada conectada covalentemente del fosfatidilinositol (anclaje a la membrana por GPI). Típicamente, para las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la molécula del MHC clase II, el dominio de transmembrana consiste en aproximadamente 25 aminoácidos hidrófobos conectados al lado carboxiterminal de los dominios  $\alpha$ 2 y  $\beta$ 2. Estos residuos permiten que la proteína atraviese la membrana. La región de transmembrana acaba con aproximadamente 10-15 residuos que comprenden la cola citoplásmica en el extremo carboxiterminal de cada una de estas cadenas. Se ha demostrado que estas regiones de transmembrana y citoplásmica pueden reemplazarse por secuencias que señalan la conexión por GPI y que las moléculas de clase II ancladas con GPI quiméricas están unidas a la membrana (Wettstein, D.A., J.J. Boniface, P.A. Reay, H. Schild y M.M. Davis, 1991, J. Exp. Med. 174:219-228). Los dominios de anclaje a la membrana conectados por GPI se han definido en un número de proteínas incluyendo el factor acelerador de las caries (DAF), CD59 y fosfatasa alcalina de placenta humana (HPAP) (Wettstein, D.A., J.J. Boniface, P.A. Reay, H. Schild y M.M. Davis, 1991, J. Exp. Med. 174:219-228; Kooyman, D.L., G.W. Byrne, S. McClellan, D. Nielsen, M. Tone, H. Waldmann, T.M. Coffman, K.R. McCurry, J.L. Platt y J.S. Logan). Por ejemplo, los 38 aminoácidos carboxiterminales de la HPAP son suficientes para actuar como una secuencia de señal para la conexión por GPI. Si la secuencia de DNA que codifica este dominio está conectada a una molécula secretada como la porción soluble de la cadena  $\alpha$  o  $\beta$  del MHC clase II, se forma una molécula quimérica unida a la membrana (Wettstein, D.A., J.J. Boniface, P.A. Reay, H. Schild y M.M. Davis, 1991, J. Exp. Med., 174:219-228), y tal sistema puede emplearse para anclar moléculas de MHC de clase II monocatenarias conectadas a péptidos a una membrana celular.

Los pesos moleculares de las moléculas de fusión del MHC variarán, particularmente dependiendo de si la molécula es soluble o de longitud completa (unida a la membrana). Un complejo de fusión del MHC clase II soluble generalmente tendrá un peso molecular de más de aproximadamente 45 kDa, y las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  maduras sin dominios de transmembrana y citoplásmico tendrán cada una un peso molecular de más de aproximadamente 20 kDa, más típicamente entre aproximadamente 21 y aproximadamente 26 kDa. Típicamente, las moléculas del MHC clase II monocatenarias maduras sin dominios de transmembrana y citoplásmico tendrán un peso molecular de aproximadamente 48 a aproximadamente 50 kDa. Para moléculas de longitud completa (unidas a la membrana), las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  maduras tendrán generalmente un peso molecular de más de aproximadamente 25 kDa, preferiblemente entre aproximadamente 26 y aproximadamente 30 kDa. Típicamente, las moléculas de fusión del MHC clase II monocatenarias maduras de la invención con un solo dominio de anclaje de transmembrana o membrana (conectado a la cadena  $\alpha$  o  $\beta$ ) tendrán un peso molecular de más de aproximadamente 49 kDa, preferiblemente entre aproximadamente 50 y 52 kDa. Todos los pesos moleculares mencionados anteriormente son mediante determinación por SDS-PAGE.

Los complejos de fusión del MHC multivalentes se prefieren para un número de aplicaciones. La valencia de un complejo de MHC-péptido antigénico influye en el efecto del complejo sobre el receptor o los receptores de células T. Por ejemplo, la activación de los hibridomas de células T 3DT52.5 requiere una molécula de MHC-antigénica que se ha hecho multivalente. Los complejos del MHC solubles monovalentes son incapaces de estimular esta célula T [Mc-

Cluskey, J. y otros (1988) J. Immunology 141, 1451-1455]. Los complejos de fusión del MHC multivalentes preferidos de la invención incluyen los conectados a una inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, IgM o Fab'. Los complejos de fusión del MHC reticulados químicamente (por ejemplo, reticulados a dendrímeros) también son especies multivalentes adecuadas. Por ejemplo, el complejo de fusión del MHC puede modificarse genéticamente incluyendo secuencias que codifican residuos de aminoácidos con cadenas laterales químicamente reactivas tales como Cys o His. Tales aminoácidos con cadenas laterales químicamente reactivas pueden situarse en una variedad de posiciones de un complejo de fusión del MHC, preferiblemente distales al péptido de presentación y al dominio de unión del complejo de fusión del MHC. Por ejemplo, el extremo C de la cadena  $\beta$  de una molécula del MHC distal del péptido de presentación puede contener adecuadamente tales aminoácido o aminoácidos reactivos. Pueden usarse cadenas laterales adecuadas para conectar químicamente dos o más complejos de fusión del MHC o una partícula de dendrímero adecuada para dar un complejo de fusión del MHC multivalente. Los dendrímeros son polímeros químicos sintéticos que pueden tener uno cualquiera de un número de grupos funcionales diferentes de su superficie [Tomalia, D.A. (1993) Aldrichimica Acta 26:91:101]. Dendrímeros ejemplares para usar de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, el dendrímero de poliamina de crecimiento en forma de estrella E9 y el dendrímero de poliamina de crecimiento en forma de peine E9, que pueden conectar residuos de cisteína.

Un vector de expresión simple de acuerdo con la invención expresa ambas cadenas de un complejo de fusión del MHC de la invención, es decir, secuencias que codifican las cadenas tanto  $\alpha$  como  $\beta$  de un complejo de fusión del MHC de la molécula monocatenaria están conectadas cada una a un solo vector de expresión. Tal vector de expresión puede proporcionar mejores resultados que cuando se usan vectores separados para cada cadena de un complejo de fusión del MHC, particularmente cuando la selección es difícil para células en las que se ha introducido el vector. También puede preferirse construir un solo vector de expresión que codifica para ambas cadenas de un complejo de fusión del MHC así como otros agentes, particularmente un factor coestimulante de células T tal como B7 o B7-2, es decir, secuencias que codifican para ambas cadenas de un complejo de fusión del MHC y una secuencia o secuencias que codifican para un factor coestimulante se conectan cada una a un vector de expresión simple, para permitir un solo procedimiento de transformación. De nuevo, este sistema evitaría la selección potencialmente difícil de células que se han transformado o transfectado dos o más veces.

Las moléculas del MHC de los complejos de fusión corresponden adecuadamente en secuencia de aminoácidos a moléculas del MHC presentes en la naturaleza, por ejemplo moléculas del MHC clase II de un ser humano, un ratón u otro roedor, u otro mamífero. Preferiblemente, al menos aproximadamente 70 por ciento de la secuencia de aminoácidos de una molécula del MHC del complejo de fusión de la invención será igual que la secuencia de aminoácidos de una molécula del MHC presente en la naturaleza tal como las mencionadas anteriormente, más preferiblemente al menos aproximadamente 90 por ciento de la secuencia de aminoácidos de una molécula del MHC del complejo de fusión de la invención será igual que la secuencia de aminoácidos de una molécula del MHC presente en la naturaleza, y aún más preferiblemente de aproximadamente 98 por ciento a la totalidad de la secuencia de aminoácidos de una molécula del MHC del complejo de fusión de la invención será igual que la secuencia de aminoácidos de una molécula del MHC presente en la naturaleza.

La presente invención también describe la detección y la caracterización de péptidos recombinantes. Por ejemplo, la invención incluye un método que puede usarse para elaborar mapas de un epítipo no caracterizado para células T como sigue: secuencias que codifican una biblioteca de péptidos aleatorios o péptidos seleccionados pueden clonarse en la posición del péptido de presentación de un sistema de vector de expresión de la invención tal como los identificados anteriormente, que contiene una secuencia de DNA que codifica una molécula del MHC y, opcionalmente, una secuencia de DNA que codifica para una secuencia conectora. Adecuadamente, se usan fragmentos de restricción de una biblioteca de cDNA o de DNA genómico apropiada (véase Sambrook y otros, anteriormente) como la fuente de las secuencias insertadas en el vector de expresión, o, alternativamente, se usan como las secuencias insertadas oligonucleótidos seleccionados tales como oligonucleótidos sintéticos de secuencia conocida. Huéspedes adecuados, tales como células de mamífero y otras identificadas anteriormente, son transformados o transfectados por el vector que contiene la fusión génica, es decir la secuencia que codifica para la molécula del MHC conectada a la secuencia que codifica para el péptido adicional. Los transformantes se cultivan bajo condiciones adecuadas y las células se rastrean para la expresión del complejo de fusión de interés que reacciona con clones de células T según se determina por los ensayos descritos posteriormente. Las colonias reactivas pueden recogerse a continuación y los vectores aislarse. El análisis de la secuencia del inserto de DNA revelaría que las secuencias peptídicas clonadas correspondían al epítipo o los epítopos reconocidos por el clon de células T.

La capacidad de un complejo de fusión del MHC para modular la actividad de un receptor de células T (incluyendo la inactivación de las respuestas de las células T) puede determinarse fácilmente mediante un ensayo *in vitro*. Típicamente, las células T para los ensayos eran proporcionadas por líneas de células T transformadas tales como hibridomas de células T o células T que se aíslan de un mamífero, por ejemplo, un ser humano, o de un roedor tal como un ratón. Los hibridomas de células T adecuados están disponibles públicamente o pueden prepararse mediante métodos conocidos. Las células T pueden aislarse de un mamífero mediante métodos conocidos. Véase, por ejemplo, Shimonkevitz, R. y otros (1983) J. Exp. Med. 158:303 y los Ejemplos 4 y 5 que siguen.

Un ensayo adecuado para determinar si un complejo de fusión del MHC es capaz de modular la actividad de células T se efectúa como sigue, mediante las etapas secuenciales 1-4 siguientes. Las células T expresan adecuadamente un marcador que puede ensayarse y que indica la activación de células T, o la modulación de la actividad de células T después de la activación. Así, por ejemplo, según se describe en el Ejemplo 4 posterior, puede emplearse el hibridoma

## ES 2 152 424 T5

de células T de murdo DO 11.10 que expresa interleuquina-2 (IL-2) durante la activación. Las concentraciones de IL-2 pueden medirse para determinar si un péptido de presentación particular es capaz de modular la actividad de este hibridoma de células T. Tal ensayo adecuado se efectúa mediante las siguientes etapas secuenciales:

- 5 1. Se obtienen células T que tienen el receptor de células T específico para el complejo de péptido/MHC, tal como de un hibridoma de células T de interés o mediante aislamiento a partir de un mamífero.
2. Las células T se cultivan bajo condiciones que permiten la proliferación.
- 10 3. Las células T que proliferan se ponen en contacto con un complejo de fusión del MHC seleccionado de la invención.
4. Las células T se ponen en contacto con las células que presentan antígeno para proporcionar la señal necesaria para la activación y se ensayan con respecto a un marcador, por ejemplo, se mide la producción de IL-2. Una  
15 disminución en la producción de IL-2, por ejemplo, una disminución de 40 por ciento o más en la producción de IL-2 después de un período de 24 horas, más típicamente una disminución de 50 por ciento o más en la producción de IL-2 después de un período de 24 horas, indica que el complejo de fusión del MHC modula la actividad de las células T y puede suprimir una respuesta inmunitaria. El Ejemplo 4 que sigue ejemplifica tal ensayo. El ensayo se emplea adecuadamente para el análisis de la actividad de complejos del MHC “truncados”  
20 solubles de la invención que no contienen una porción de membrana. Además, el ensayo se emplea adecuadamente para la identificación de complejos de fusión del MHC de la invención que contienen un péptido de presentación conectado covalentemente que funciona como un antagonista o un agonista parcial de receptores de células T.
- 25 Las células T empleadas en los ensayos se incuban bajo condiciones adecuadas para la proliferación. Por ejemplo, un hibridoma de células T DO 11.10 se incubaba adecuadamente a aproximadamente 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% en medio de cultivo completo (RPMI 1640 complementado con FBS al 10%, penicilina/estreptomicina, L-glutamina y 2-mercaptoetanol 5 x 10<sup>-5</sup> M). Diluciones en serie del complejo de fusión del MHC de la invención pueden añadirse al medio de cultivo de células T. Las concentraciones adecuadas del complejo de fusión del MHC añadidas a las células típicamente  
30 estarán en el intervalo de 10<sup>-12</sup> a 10<sup>-6</sup> M. Se proporcionan señales de activación de células T mediante células que presentan antígeno que se han cargado con el péptido antigénico apropiado. Se cree que el uso de una dosis de antígeno y números APC que dan una activación de células T ligeramente submáxima se prefiere para detectar la inhibición de respuestas de células T con complejos de fusión del MHC de la invención. Una disminución en la producción de IL-2 después del contacto con el complejo de fusión del MHC indica que el complejo de fusión modula la actividad de las  
35 células T y puede suprimir la respuesta inmunitaria.

Alternativamente, en vez de la medida de una proteína expresada tal como IL-2, puede determinarse adecuadamente la modulación de la activación de las células T mediante cambios en la proliferación de células T dependiente de antígeno según se mide mediante técnicas de radiomarcado que son conocidas en la industria. Por ejemplo, un nucleótido marcado (por ejemplo, tritiado) puede introducirse en un medio de cultivo de ensayo. La incorporación de tal nucleótido etiquetado en DNA sirve como una medida de la proliferación de células T. Véase el Ejemplo 5 que sigue, donde tal procedimiento se describe específicamente. Este ensayo no es adecuado para células que no requieren la presentación de antígeno para el crecimiento, por ejemplo, hibridomas de células T. Es adecuado para la medida de la modulación por los complejos de fusión del MHC de la activación de células T para células T no transformadas aisladas de mamíferos. Una disminución en el nivel de la proliferación de células T después del contacto con el complejo de fusión del MHC indica que el complejo de fusión modula la actividad de las células y puede suprimir la respuesta inmunitaria, por ejemplo, véase el Ejemplo 5 que sigue. El ensayo de proliferación de células T *in vitro* se prefiere para medir los efectos de complejos de fusión del MHC de la invención sobre cambios específicos para antígenos en la expansión clonal de células T *in vivo*. Tal ensayo se describe específicamente en el Ejemplo 7 que  
50 sigue.

Estos ensayos *in vitro* pueden emplearse para seleccionar e identificar un péptido o péptidos, codificados por DNA de una biblioteca aleatoria u otros oligonucleótidos, que son capaces de modular la actividad de un receptor de células T (incluyendo la activación o la inhibición del desarrollo de células T). Específicamente, pueden clonarse secuencias de DNA que codifican una biblioteca de péptidos aleatorios o péptidos seleccionados en la posición del péptido de presentación de un sistema de vector de expresión de la invención, tales como los identificados anteriormente, que contiene una secuencia de DNA que codifica una molécula del MHC y, opcionalmente, una secuencia de DNA que codifica para una secuencia conectora. Adecuadamente, se usan fragmentos de restricción de un cDNA apropiado de una biblioteca de DNA genómico (véase Sambrook y otros, anteriormente) como una fuente de las secuencias insertadas en el vector de expresión o, alternativamente, se usan oligonucleótidos seleccionados, tales como oligonucleótidos sintéticos de secuencia conocida, como la secuencia insertada. Se transforman huéspedes adecuados, tales como células de mamífero y otros identificados anteriormente, con el vector que contiene la fusión génica, por ejemplo, la secuencia que codifica para la molécula del MHC conectada a una secuencia que codifica para el péptido de presentación. Los transformantes se cultivan bajo condiciones adecuadas y las células se rastrean con respecto a la expresión del complejo de fusión del MHC de interés poniendo en contacto el mismo con células T seleccionadas. Se emplean ensayos descritos anteriormente, por ejemplo, la medida de la producción de IL-2 o la proliferación de células T, para determinar si el contacto con el complejo de fusión del MHC modulaba la activación de células T. Por ejemplo, una disminución en la producción de IL-2 de células estimuladas con APC identifica los complejos de fusión del MHC que  
65

modulan la actividad de las células T y suprimen las respuestas inmunitarias. Alternativamente, los ensayos *in vitro* pueden emplearse para identificar complejos de fusión del MHC multivalentes de la invención descritos anteriormente, que contenían péptidos de presentación que incrementan las respuestas de células T.

Los ensayos *in vivo* también pueden emplearse adecuadamente para determinar la capacidad de un complejo de fusión del MHC para modular la actividad de células T, incluyendo la actividad para inhibir o inactivar el desarrollo de células T. Por ejemplo, un complejo de fusión del MHC de la invención puede ensayarse con respecto a su capacidad para inhibir el cambio de clase de inmunoglobulina (es decir de IgM a IgG). Véase, por ejemplo, Linsley, P.S. y otros (1992) *Science* 257:792-795. Tal ensayo se describe específicamente en el Ejemplo 6 que sigue.

También se proporcionan métodos de diagnóstico que usan moléculas de fusión del MHC, incluyendo obtención de imágenes de diagnóstico *in vivo* y tipificación del HLA [véase, por ejemplo, A.K. Abbas, *Cellular and Molecular Immunology*, página 328 (W.B. Saunders Co. 1991)]. Para aplicaciones de obtención de imágenes *in vivo*, una molécula de fusión del MHC de la invención que tiene un marcador radiactivo (por ejemplo,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ) u otra etiqueta detectable puede administrarse a un mamífero y el sujeto puede explorarse mediante procedimientos conocidos con respecto a la unión de la molécula del MHC. Tal análisis del mamífero podría ayudar al diagnóstico y el tratamiento de un número de trastornos incluyendo, por ejemplo, respuestas inmunitarias no deseadas, según se describe aquí.

También pueden emplearse ensayos para evaluar el uso potencial de un complejo del MHC para el tratamiento de un trastorno inmunitario. Por ejemplo, la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) es una enfermedad autoinmune en ratones y un modelo reconocido para la esclerosis múltiple. Una raza de ratón adecuada puede tratarse para desarrollar EAE y a continuación un complejo de fusión del MHC de la invención puede administrarse y el animal evaluarse para determinar si el desarrollo de la EAE se inhibe o se evita después de la administración del complejo de fusión del MHC. Tal ensayo se describe específicamente en los Ejemplos 8 y 11 que siguen.

La capacidad de un complejo de fusión del MHC para inducir una respuesta inmunitaria, incluyendo proporcionar vacunación contra un trastorno elegido, puede determinarse fácilmente mediante un ensayo *in vivo*. Por ejemplo, un complejo de fusión del MHC de la invención, o DNA que codifica para un complejo de fusión del MHC de la invención, puede administrarse a un mamífero tal como un ratón, pueden obtenerse muestras de sangre del mamífero en el momento de la administración inicial y varios momentos periódicamente posteriores (por ejemplo a las 2, 5 y 8 semanas después de la administración del complejo de fusión o el DNA). Se recoge suero de las muestras de sangre y se ensaya con respecto a la presencia de anticuerpos originados por la inmunización. Las concentraciones de anticuerpo pueden determinarse. El Ejemplo 9 que sigue describe específicamente tal ensayo.

Según se analiza anteriormente, la invención describe la administración directa de una construcción de DNA que codifica para un complejo de fusión del MHC de la invención para la expresión del complejo de fusión dentro de células del sujeto. Preferiblemente, DNA que tiene las regiones de codificación de la fusión de MHC-péptido de presentación, adecuadamente bajo el control de un promotor apropiado tal como el promotor de CMV, se inyecta directamente a músculo esquelético del sujeto. Para asegurar la presencia de las moléculas de fusión del MHC se inducirá una respuesta inmunitaria en el sujeto, se co-administran preferiblemente al sujeto vectores de DNA que codifican para un factor co-estimulante con el DNA que codifica para la fusión de MHC-péptido de presentación. Vectores de DNA co-administrados preferidos incluyen, por ejemplo, los que comprenden la región de codificación de B7-1 o B7-2 bajo el control del promotor de CMV. La proteína B7-1 y B7-2 expresada puede proporcionar la señal co-estimulante para ayudar a la iniciación de la respuesta inmunitaria.

Tal sistema para la inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto, tal como un mamífero, ofrece ventajas significativas sobre sistemas anteriores. La etapa inicial en la presentación de un antígeno proteínico extraño es la unión del antígeno natural a una célula que presenta antígeno (APC). Después de la unión a APCs, los antígenos entran en las células, mediante fagocitosis, endocitosis mediada por receptores o pinocitosis. Tales antígenos internalizados se localizan en vesículas intracelulares unidas a las membranas llamadas endosomas. Después de la fusión de endosoma-lisosoma, los antígenos se procesan en péptidos pequeños mediante proteasas celulares situadas en los lisosomas. Los péptidos se asocian con las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de moléculas del MHC clase II dentro de estos lisosomas. Estas moléculas del MHC clase II, previamente sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso, se transportan secuencialmente a los complejos de Golgi y a continuación al compartimento lisosómico. El complejo de péptido-MHC se presenta sobre la superficie de APCs para la activación de células T y B. Por lo tanto, la accesibilidad de sitios de procesamiento proteolíticos dentro del antígeno, la estabilidad de los péptidos resultantes en el lisosoma y las afinidades de los péptidos para las moléculas del MHC son factores determinantes para la inmunogenicidad de un epítipo particular. Estos factores no pueden cambiarse mediante la administración de adyuvantes. La expresión directa de los complejos de fusión del MHC de la invención, (es decir, MHC conectado covalentemente directamente al péptido de presentación), sin embargo, debe evitar tales complicaciones e inducir una respuesta inmunitaria contra el epítipo soportado en las moléculas de fusión del MHC.

Además, en lugar de administrar directamente a un sujeto DNA que codifica para un complejo de fusión del MHC de la invención, pueden administrarse al sujeto células que presentan antígeno compatibles con el huésped en las que se ha introducido DNA. Esto es, DNA que codifica para uno o más complejos de fusión del MHC de la invención puede introducirse en células que presentan antígeno compatibles con el huésped y tales células que presentan antígeno transformadas o transfectadas pueden administrarse al huésped elegido, y con el sitio elegido en el que tendría lugar la interacción más eficaz con la célula T apropiada. Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 13 y 14

que siguen. Al administrarlas a un sujeto, tales células tratadas mediante ingeniería pueden expresar a continuación *in vivo* sobre la superficie celular el complejo de fusión del MHC codificado por el DNA. Tales células tratadas mediante ingeniería pueden administrarse a un sujeto para inducir una respuesta inmunitaria o alternatively para suprimir una respuesta inmunitaria, según se describe aquí, dependiendo de la expresión de otras señales co-estimulantes de las células. Esto es, si durante la administración las células pueden proporcionar un complejo de fusión del MHC en ausencia de una cantidad eficaz de una señal o señales co-estimulantes, o proporcionar un complejo de fusión del MHC que contiene un péptido de presentación con actividad antagonista o agonista parcial, las células pueden administrarse a un huésped para suprimir una respuesta inmunitaria. Alternativamente, si las células pueden proporcionar un complejo de fusión del MHC en presencia de una cantidad eficaz de una señal o señales co-estimulantes, por ejemplo, si un factor co-estimulante de células T tal como B7 o B7-2 se expresa sobre la superficie de las células, las células pueden administrarse a un huésped mamífero para inducir una respuesta inmunitaria en el mamífero, según se describe aquí. Puede preferirse construir una sola expresión que codifica para ambas cadenas de un complejo de fusión del MHC así como para un factor co-estimulante de células T si se emplea, según se analiza anteriormente, e introducir ese vector en una APC compatible con el huésped para preparar las células para la administración. Como será apreciado por los expertos en la técnica, el término células que presentan antígeno “compatibles con el huésped” significa células que presentan antígeno que son del mismo haplotipo que el sujeto o “huésped” al que se administran las células. Preferiblemente, las células que presentan antígeno compatibles con el huésped transformadas son las que pueden migrar a los nodulos linfáticos del sujeto al que se han administrado las células y, en ese sitio, expresar el complejo de fusión del MHC.

Según se analiza anteriormente, los complejos de fusión del MHC y las construcciones de DNA que codifican tales complejos de fusión tienen un número de aplicaciones terapéuticas.

Por ejemplo, los complejos de fusión del MHC que no contienen una porción de transmembrana (véase, por ejemplo, el complejo soluble del Ejemplo 2 que sigue) pueden administrarse para suprimir una respuesta inmunitaria de un mamífero, por ejemplo, para tratar a un mamífero, incluyendo un ser humano, que sufre o es susceptible a un trastorno autoinmune tal como, por ejemplo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus insulino dependiente, artritis reumatoide y similares. También son adecuados para el tratamiento los sujetos que sufren o son propensos a sufrir una respuesta inmunitaria no deseada, por ejemplo pacientes que han sufrido algún tipo de cirugía de trasplante, tal como trasplante de corazón, riñón, piel u otros órganos. En tales situaciones, un procedimiento de tratamiento puede comenzarse adecuadamente antes del procedimiento quirúrgico.

Preferiblemente, para suprimir una respuesta inmunitaria, se administra un complejo de fusión del MHC que está conectado a una inmunoglobulina, por ejemplo, fusionado a los dominios constantes de una molécula de inmunoglobulina tal como una inmunoglobulina IgG, IgM o IgA o un fragmento. Véase la figura 1C de los dibujos y los ejemplos que siguen.

Puede emplearse un número de sistemas distintos para suprimir una respuesta inmunitaria de un mamífero, de acuerdo con la invención.

Específicamente, según se analiza anteriormente, se ha observado que una molécula del MHC sólo inducirá la expansión clonal de una línea de células T específica si también se aportan una señal o señales co-estimulantes tales como de células que presentan antígeno. En ausencia de señales co-estimulantes, o al menos en ausencia del aporte de una cantidad eficaz para la proliferación de células T de tal señal o señales co-estimulantes de células T, las células T serán inducidas a un estado de anergia o apoptosis que da como resultado la delección clonal.

De acuerdo con esto, un método de tratamiento para la supresión de una respuesta inmunitaria proporciona la administración de una cantidad eficaz de uno o más complejos de fusión del MHC en ausencia sustancial de cualesquiera señal o señales co-estimulantes para inducir de ese modo la anergia para células T específicas y suprimir eficazmente una respuesta inmunitaria no deseada. Preferiblemente, se administra un complejo del MHC soluble “truncado”, es decir el complejo del MHC no contiene una porción de transmembrana. El péptido de presentación del complejo de fusión del MHC soluble administrado puede seleccionarse de los que son específicos para células T de una respuesta inmunitaria no deseada para inducir un estado de anergia con respecto a esas células T. Tales péptidos de presentación pueden identificarse y seleccionarse fácilmente mediante los procedimientos *in vitro* identificados anteriormente.

Los complejos de fusión del MHC solubles adecuadamente pueden administrarse a un mamífero mediante inyección, por ejemplo inyección intraperitoneal o intravenosa. También sería posible la administración tópica, por ejemplo, gotas oculares, y la administración a través de inhaladores nasales y pulmonares. Un complejo de fusión del MHC de la invención, al menos los complejos usados en aplicaciones terapéuticas, debe producirse en células de mamífero y purificarse antes del uso de modo que esté esencialmente o completamente libre de cualquier bacteria o pirógeno. La dosis óptima para una aplicación terapéutica dada puede determinarse por medios convencionales.

Los complejos de fusión del MHC pueden administrarse adecuadamente a un sujeto (particularmente un mamífero tal como un ser humano o ganado tal como vacas) en composiciones de tratamiento o farmacéuticas que comprenden el complejo de fusión. Tales composiciones farmacéuticas de la invención se preparan y se usan de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las formulaciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo de fusión del MHC de la invención pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (lío filizado)

que requiere sólo la adición del portador líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de usar. Las formulaciones liposómicas también pueden preferirse para muchas aplicaciones. Otras aplicaciones para la administración parenteral también serán adecuadas e incluirán soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido; y soluciones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

Otro método de tratamiento para la supresión de una respuesta inmunitaria proporciona la administración de un complejo de fusión del MHC que contiene un péptido de presentación conectado covalentemente que es un antagonista o un agonista parcial de receptores de células T. Véase Sette, A. y otros (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12: 413-431. El complejo de fusión del MHC puede ser una forma truncada y puede administrarse como una proteína soluble según se describe anteriormente. Alternativamente, el complejo de fusión del MHC puede ser de longitud completa, es decir contendrá una porción de transmembrana. El tratamiento con estos complejos comprenderá la administración a un mamífero de una cantidad eficaz de una secuencia de DNA que comprende un vector de DNA que codifica el complejo de fusión del MHC de longitud completa y un péptido de presentación que es un antagonista o un agonista parcial de TcR. Véase, por ejemplo, el análisis anterior y los Ejemplos 3, 10 y 11 que siguen para medios adecuados de preparación de tales complejos de fusión del MHC y el uso de los mismos para la terapia inmunosupresiva. Los péptidos de presentación que son antagonistas o agonistas parciales de TcR pueden identificarse y seleccionarse fácilmente mediante los procedimientos *in vitro* identificados anteriormente. Un complejo de fusión del MHC que contiene un péptido de presentación que es un antagonista o un agonista parcial de receptores de células T se prefiere particularmente para el tratamiento de alergias y enfermedades autoinmunitarias tales como esclerosis múltiple, diabetes mellitus insulino dependiente y artritis reumatoide.

Además, según se analiza anteriormente, las células que presentan antígeno compatibles con el huésped en las que se ha introducido DNA que codifica para un complejo de fusión del MHC pueden administrarse a un sujeto para suprimir una respuesta inmunitaria. Durante la administración las células expresan un complejo de fusión del MHC en ausencia de una cantidad eficaz de señal o señales co-estimulantes de células T, es decir tal que se induce la anergia de células T, y/o las células administradas expresan un complejo de fusión del MHC que contiene un péptido de presentación conectado con actividad antagonista o agonista parcial.

También pueden usarse diferentes terapias inmunosupresoras en combinación así como con otros agentes inmunosupresores conocidos tales como fármacos antiinflamatorios, para proporcionar un tratamiento más eficaz de un trastorno mediado por células T. Por ejemplo, los complejos de fusión del MHC inmunosupresores pueden usarse en combinación con agentes antiinflamatorios tales como corticosteroides y fármacos no esteroideos para el tratamiento de trastornos autoinmunes y alergias.

La invención también describe métodos para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero tal como un ser humano, incluyendo vacunar un mamífero tal como un ser humano contra un agente infeccioso o un trastorno elegido tal como el cáncer, particularmente un cáncer de melanoma, u otro trastorno tal como la malaria.

Estos métodos comprenden administrar a un mamífero una cantidad eficaz de una secuencia de DNA que comprende un vector de DNA que codifica para un complejo de fusión del MHC que contiene una porción de transmembrana, y/o la administración de tal complejo de fusión del MHC que contiene una porción de transmembrana y/o la administración de células que presentan antígeno compatibles con el huésped que contienen tal DNA que codifica para tales complejos de fusión del MHC. La preparación de vectores de expresión de complejos de fusión del MHC se describe anteriormente y en los Ejemplos 3 y 12 que siguen. Se han presentado métodos para la administración de DNA plasmídico, la captación del DNA por células del sujeto administrado y la expresión de la proteína. Véase Ulmer, J.B. y otros, *Science* (1993) 259: 1745-1749.

Preferiblemente, el DNA que codifica para un complejo de fusión del MHC de longitud completa se administra a un mamífero junto con una secuencia de DNA que codifica para un factor co-estimulante de células T tal como DNA que codifica para B7 o B7-2. El gen B7 y la expresión del mismo se describen en Harlan, D. y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91: 3137-3141. Durante la captación de ese DNA por las células del sujeto, el factor co-estimulante de células T se expresará y puede proporcionar la señal o las señales co-estimulantes y de ese modo ayudar a la iniciación de la respuesta inmunitaria. Véanse los Ejemplos 12 y 13 que siguen y describen la construcción de vectores de expresión que contienen genes B7 o B7-2.

Aunque la administración de DNA que codifica para un complejo de fusión del MHC de la invención a un mamífero tal como un ser humano según se describe anteriormente es un método preferido para provocar una respuesta inmunitaria en el sujeto, los complejos de fusión del MHC también pueden administrarse adecuadamente mediante otras rutas. Así, según se analiza anteriormente, pueden administrarse a un sujeto células que presentan antígeno compatibles con el huésped en las que se ha introducido DNA que codifica para un complejo de fusión del MHC de la invención, para inducir una respuesta inmunitaria. Durante la administración las células expresan un complejo de fusión del MHC de la invención en presencia de una cantidad eficaz de una señal o señales co-estimulantes de células T, tales como genes B7 o B7-2, para provocar una respuesta inmunitaria, y/o las células administradas expresan un complejo de fusión del MHC de longitud completa que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria, por ejemplo según se muestra por un incremento en la proliferación de células T tal como mediante los procedimientos detalladas en los ejemplos que siguen. Aunque típicamente menos preferidos que los sistemas tratados anteriormente, los complejos de

fusión del MHC de la invención que son capaces de provocar una respuesta inmunitaria también pueden administrarse directamente a un sujeto, por ejemplo un complejo de fusión del MHC de longitud completa que contiene un péptido de presentación antigénico conectado covalentemente que puede estimular o inducir la proliferación de células T.

Los métodos para inducir una respuesta inmunitaria, incluyendo vacunar a un sujeto contra un trastorno elegido, pueden usarse en combinación con métodos conocidos para inducir una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, un complejo de fusión del MHC, o una construcción de DNA que codifica para tal complejo de fusión del MHC, puede administrarse a un sujeto en coordinación o combinación con la administración de una composición de vacuna, para estimular o prolongar el efecto deseado de tal composición de vacuna.

Los vectores de DNA que codifican complejos de fusión del MHC se administran adecuadamente a un mamífero, incluyendo un ser humano, preferiblemente mediante inyección intramuscular. La administración de cDNA a músculo esquelético de un mamífero con la captación posterior del vector de expresión administrado por las células musculares y la expresión de proteína codificada por el DNA ha sido descrita por Ulmer y otros y representa un procedimiento ejemplar [Ulmer, J.B. y otros, Science 259: 1745-1749]. La dosis óptima para una aplicación terapéutica dada puede determinarse por medios convencionales.

Adicionalmente, los complejos de fusión del MHC, los vectores de DNA que codifican tales complejos y las células que presentan antígenos compatibles con el huésped que contienen tales vectores de DNA de la invención pueden administrarse cada uno adecuadamente a un sujeto mediante una variedad de otras rutas. Por ejemplo, para inducir una respuesta inmunitaria, puede ser preferible administrar intradérmicamente a un sujeto vectores de DNA que codifican complejos de fusión del MHC antigénicos de las invenciones, solos o junto con DNA que codifica para un factor co-estimulante, mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Tal administración puede dar como resultado la transformación de células que presentan antígeno intradérmicas (por ejemplo, células dendríticas) y la proliferación de células T. Véanse los resultados del Ejemplo 16 que sigue. Los complejos de fusión del MHC y los vectores de DNA que codifican tales complejos de fusión también pueden administrarse a un sujeto mediante otras rutas, por ejemplo oralmente o transdérmicamente.

Además del tratamiento de trastornos de seres humanos, los complejos de fusión del MHC de la invención y las construcciones de DNA que codifican tales complejos de fusión tendrán un uso significativo para aplicaciones veterinarias, por ejemplo, el tratamiento de trastornos de ganado tal como vacas, ovejas, etc. y mascotas tales como perros y gatos.

Aunque los complejos de fusión del MHC descritos en la invención o las construcciones de DNA que codifican para tales complejos de fusión pueden administrarse solos a un sujeto, también pueden usarse como parte de una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden en general uno o más complejos de fusión del MHC de la invención o construcciones de DNA que codifican para tales complejos de fusión junto con uno o más portadores aceptables. Los portadores deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de la misma. Por ejemplo, para la administración parenteral, tal como mediante una formulación para inyección, puede prepararse una solución o suspensión estéril con agua, u otras soluciones farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones farmacéuticas se preparan adecuadamente mediante métodos conocidos en la técnica.

Se apreciará que las cantidades preferidas reales de un complejo de fusión del MHC descrito en la invención dado o una construcción de DNA que codifica para el mismo usados en una terapia dada variarán con el compuesto o los compuestos activos particulares que se utilizan, las composiciones particulares formuladas, el modo de aplicación, el sitio particular de administración, el peso del paciente, la salud general, el sexo, etc., la indicación particular que se trata, etc. y otros factores tales que son reconocidos por los expertos en la técnica, incluyendo el médico o veterinario asistente. Los grados de administración óptimos para un procedimiento de administración dado pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica usando pruebas de determinación de la dosificación convencionales efectuadas, por ejemplo, con respecto a las pautas precedentes y los ensayos descritos aquí.

Todos los documentos mencionados aquí se incorporan aquí mediante referencia en su totalidad.

Los siguientes ejemplos no limitativos son ilustrativos de la invención.

#### Ejemplos 1A-1F

##### *Construcción de complejos de fusión del MHC solubles de la invención*

Se prepararon vectores de fusión del MHC clase II-péptido para expresar moléculas del MHC clase II solubles con péptidos de presentación conectados covalentemente, según se describe posteriormente en los Ejemplos 1A-1F. Los genes del MHC clase II usados para preparar las siguientes construcciones de complejos de fusión del MHC se aislaron mediante amplificación por PCR de cDNA generado a partir de la Célula que Presenta Antígeno (APC) apropiada, según se muestra en las Figuras 2-8 de los dibujos.

## Ejemplo 1A

Para los genes I-A<sup>d</sup>, se aisló RNA total de la línea celular A20 del linfoma de células B de ratón. Brevemente, se homogeneizaron 1 x 10<sup>8</sup> células A20 (ATCC TIB 208) en 6 ml de tiocianato de guanidinio 4 M enfriado con hielo, Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, usando un homogeneizador Tissue Tearer durante 5 minutos. Después de la homogeneización, se añadió sarcosilo hasta una concentración final de 0,5% y la solución se mezcló a fondo. El homogenado se centrifugó a 5000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se llevó hasta 10 ml con tiocianato de guanidinio 4 M, Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, tampón de sarcosilo al 0,5%. El sobrenadante se dispuso en forma de capa suavemente en la parte superior de un colchón de 3,5 mm de CsCl 5,7 M, EDTA 0,01 M, pH 7,5, en un tubo de ultracentrífuga transparente SW41. Las muestras se centrifugaron en un rotor SW41 a 32.000 rpm durante 24 horas a 20°C. Después de la centrifugación, el sobrenadante se retiró cuidadosamente y el pellet de RNA se lavó con etanol al 70%. El RNA se disolvió en 350 µl de agua tratada con DEPC que contenía 40 unidades de RNasin (Promega). El RNA se precipitó con 35 µl de acetato sódico 3 M y 970 µl de etanol. Este procedimiento daba aproximadamente 370 µg de RNA total. El RNA se suspendió hasta 5 µg/µl con agua tratada con DEPC y se usó para la clonación por RT-PCR de los genes I-A<sup>d</sup>. La figura 2 de los dibujos muestra la estrategia para aislar el fragmento génico  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  de I-A<sup>d</sup> (que codifica de aa1 a 182) y la figura 8 de los dibujos lista los cebadores oligonucleotídicos usados. El RNA total de A20 (5 µg) se convirtió en cDNA usando Superscript-MLV Reverse Transcriptase (GIBCO-BRL) y un cebado específico para  $\alpha 2$  de acuerdo con los procedimientos del fabricante. De los 20 µl de cDNA generados, 2 µl se usaron como DNA de molde para PCR. Las reacciones de amplificación por PCR típicas (100 µl) contenían DNA de molde, 10 pmoles de los cebadores apropiados (OPR100 y OPR101), 2,5 unidades de polimerasa de *Taq*, dNTP 100 µM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, gelatina al 0,01%. El molde se desnaturalizó mediante una incubación inicial a 96°C durante 5 minutos, mientras la polimerasa de *Taq* se añadía para iniciar en caliente la reacción. Los productos deseados se amplificaron mediante 10 ciclos térmicos de 55°C durante 1 minuto, 70°C durante 2 minutos, a continuación 96°C durante 1 minuto, seguidos por 25 ciclos por etapas de 70°C durante 1 minuto y a continuación 96°C durante 1 minuto. El producto de PCR  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  inicial (aproximadamente 550 pb) se diseñó para clonarse en el vector de expresión bacteriano, pJRS139. Los productos de PCR de 5 reacciones se reunieron, se precipitaron con 2 volúmenes de etanol/acetato sódico 0,3 M, y los productos resultantes (aproximadamente 0,2 µg de DNA) se resuspendieron en agua. El fragmento génico  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  se digirió con *NcoI* y *SpeI*, se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificó mediante elución del gel de agarosa. Los productos de PCR digeridos purificados se ligaron a continuación en pJRS139 digerido con *NcoI/SpeI*. El fragmento génico  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  clonado en pJRS139 se denominaba 39AD2 y servía como el molde para que la amplificación por PCR añadiera sitios de restricción y secuencias de flanqueo necesarios para la clonación y la expresión en los vectores de expresión de mamífero. En estas reacciones, se usaron 0,5 ng de 39AD2 digerido con *NcoI* como un molde, OPR107 y OPR108 eran los cebadores y las condiciones de PCR eran 5 ciclos térmicos de 60°C durante 1 minuto, 70°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto seguidos por 20 ciclos por etapas de 70°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto. El producto de PCR  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  (aproximadamente 590 pb) contiene un sitio *EcoRV* 5' y un sitio *EagI* 3' para la clonación entre el intrón líder y el intrón de la región J del vector lanzadera de la cadena kappa de IgG (véase la figura 9A de los dibujos). Además, el producto de PCR tiene los sitios de corte y empalme y las secuencias líder de IgG necesarios para la expresión apropiada de la proteína de fusión de MHC-IgG. Los productos de PCR se digirieron con *EcoRV* y *EagI* y se purificaron en gel. Los productos de PCR digeridos purificados se ligaron a continuación en pBlueScript II SK + (Stratagene) digerido con *EcoRV/EagI* dando como resultado la construcción pA19. Este vector se digirió con *EcoRV* y *EagI* y el fragmento génico  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  resultante se subclonó en el vector lanzadera de IgG pJW003 según se describe en el Ejemplo 2 posterior.

## Ejemplo 1B

El siguiente procedimiento se empleó para aislar el fragmento génico  $\beta 1$ - $\beta 2$  de I-A<sup>d</sup> (que codifica de aa1 a 189), enlazando la secuencia líder e insertando los oligonucleótidos que codifican los péptidos antigénicos. Este sistema también se representa en la figura 3 de los dibujos. El RNA total de A20 (10 µg) se convirtió en cDNA usando Superscript-MLV Reverse Transcriptase (GIBCO-BRL) y cebado específico para oligo dT de acuerdo con los procedimientos del fabricante. De los 20 µl de cDNA generados, 2 µl se usaron como DNA de molde para PCR. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe anteriormente excepto que los cebadores oligonucleotídicos eran OPR102 y OPR104 (véase la figura 8 de los dibujos) y las condiciones de PCR eran 100 ciclos térmicos de 60°C durante 1 minuto, 70°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto seguidos por 40 ciclos por etapas de 70°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto. El producto de PCR  $\beta 1$ - $\beta 2$  inicial (aproximadamente 570 pb) se diseñó para clonarse en el vector de expresión bacteriano, pJRS139. Los productos de PCR se digirieron con *NcoI* y *SpeI* y se purificaron en gel de la misma manera que se describe anteriormente. Los productos de PCR digeridos purificados se ligaron a continuación en pJRS139 digerido con *NcoI/SpeI*. El fragmento génico  $\beta 1$ - $\beta 2$  clonado en pJRS139 se denominó 39BD2 y servía como el molde para que la amplificación por PCR añadiera la secuencia conectora y los sitios de restricción y las secuencias de flanqueo necesarios para la clonación y la expresión en los vectores de expresión de mamífero. En estas reacciones, se usaron 0,5 ng de 39AB2 digerido con *NcoI* como un molde, OPR107 y OPR108 eran los cebadores y las condiciones de PCR eran 5 ciclos térmicos de 60°C durante 1 minuto, 70°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto, seguidos por 20 ciclos por etapas de 70°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto. El producto de PCR de conector- $\beta 1$ - $\beta 2$  (aproximadamente 640 pb) contiene un sitio *EcoRV* 5' y un sitio *EagI* 3' para la clonación entre el intrón líder y el intrón de la región J del vector lanzadera de cadena pesada de IgG (figura 9B). Además, el producto de PCR tiene los sitios de corte y empalme y las secuencias líder de IgG necesarios para la expresión apropiada de la proteína de fusión de MHC-IgG. Para permitir la clonación de las secuencias de péptidos antigénicos, se trató mediante ingeniería un sitio *AflIII* en el extremo de la secuencia de señal y estaba presente un sitio *NheI* al principio

del conector. Los productos de PCR se digirieron con *EcoRV* y *EagI* y se purificaron en gel. Los productos de PCR digeridos purificados se ligaron a continuación en pBlueScript II SK + (Stratagene) digerido con *EcoRV/EagI* dando como resultado la construcción pB15. La secuencia y los análisis de restricción indicaban que esta construcción contenía una mutación en el sitio *EcoRV*. Para corregir esta mutación, se reasociaron dos oligonucleótidos (OPR119 y OPR120-2) y se ligaron en pB15 digerido con *HindIII/NheI*, dando como resultado el vector, pBC1. Para insertar secuencias que codifican los péptidos que se unen a I-A<sup>d</sup> de clase II, los oligonucleótidos se reasociaron y se ligaron en pBC1 digerido con *AflIII/NheI*. El péptido Ova 323-339 (SISQAVHAAHAEINEAGR) (ID SEC N°: 3) estaba codificado por los oligonucleótidos OPR110 y OPR111, Ova:H331R (SISQAVHAAHAEINEAGR) (ID SEC N°: 4) por OPR115 y OPR116, Ova A331Y (SISQAVHAAHYEINEAGR) (ID SEC N°: 5) por OPR117 y OPR118, y HEL 74-86 (NLCNIPCSALLSS) (ID SEC N°: 6) por OPR140 y OPR141. Las construcciones respectivas en la cadena principal de pBC1 se denominaron pB16, pB24, pB37 y pB4. Estos vectores se digirieron con *EcoRV* y *EagI* y el péptido-conector-fragmento génico  $\beta$ 1- $\beta$ 2 resultante se subclonó en el vector lanzadera de IgG pJW009 según se describe en el Ejemplo 2 que sigue.

#### Ejemplo 1C

El siguiente sistema se empleó para aislar el fragmento génico  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2-bisagra de HLA-DR1 humano (que codifica de aa1-192) y se representa en la Figura 4 de los dibujos. Se elaboró RNA celular total mediante el procedimiento descrito anteriormente a partir de 3 x 10<sup>6</sup> células BLCL-K68 obtenidas a partir de un individuo homocigótico HLA-DR1. El RNA total se convirtió en cDNA (20  $\mu$ l) usando Superscript-MLV Reverse Transcriptase (GIBCO-BRL) y cebado específico para oligo dT de acuerdo con los procedimientos del fabricante. Las reacciones de PCR iniciales se diseñaron para añadir sitios de restricción necesarios para la clonación del fragmento génico  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2-bisagra de vectores de expresión bacterianos (para un trabajo que no es relevante para esta solicitud). Las PCRs se realizaron como se describe anteriormente, excepto que se usaron 5  $\mu$ l del cDNA de molde, los cebadores eran DR1A-F y DR1A-B (figura 8) y las condiciones de PCR eran 10 ciclos térmicos de 55°C durante 1 minuto, 70°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto seguidos por 20 ciclos por etapas de 70°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto. El producto de PCR  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2-bisagra (aproximadamente 570 pb) se digirió con *HindIII* y *BamHI*, se purificó en gel y se ligó en pUC18 digerido con *HindIII/BamHI*, dando como resultado el vector K68A3. Este vector (0,5 ng) servía como un molde para amplificaciones por PCR adicionales usando oligonucleótidos AF-N y AB-S como cebadores. El producto de PCR  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2-bisagra resultante se digirió con *NcoI* y *SpeI*, se purificó en gel y se ligó en pJRS139 digerido con *NcoI/SpeI*, dando como resultado el vector 39A2. Este vector servía como un molde para que la amplificación por PCR añadiera la secuencia conectora y los sitios de restricción y las secuencias de flanco necesarias para la clonación y la expresión en los vectores de expresión de mamífero. Las PCRs se realizaron como se describe anteriormente, excepto que se usaron 10 ng DNA de molde de 39A2 digerido con *NcoI*, los cebadores eran OPR124 y OPR125 (las secuencias de los mismos indicadas en la figura 8 de los dibujos) y las condiciones de PCR eran 5 ciclos térmicos de 50°C durante 1 minuto, 70°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto, seguidos por 10 ciclos por etapas de 70°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto. El producto de PCR  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2-bisagra (aproximadamente 610 pb) contiene un sitio *EcoRV* 5' y un sitio *EagI* 3' para la clonación entre el intrón líder y el intrón de la región J del vector lanzadera de la cadena kappa de IgG (véase la figura 9e de los dibujos). Además, el producto de PCR tiene los sitios de corte y empalme de IgG y las secuencias líder necesarias para la expresión apropiada de la proteína de fusión de MHC-IgG. Los productos de PCR se digirieron con *EcoRV* y *EagI* y se purificaron en gel. Los productos de PCR digeridos purificados se ligaron a continuación en A19 digerido con *EcoRV/EagI* dando como resultado la construcción pBS-DR1A. Este vector se digirió con *EcoRV* y *EagI* y el fragmento génico  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2-bisagra de HLA-DR1 se subclonará en el vector lanzadera de IgG pJW003 según se describe en el Ejemplo 2 que sigue.

#### Ejemplo 1D

El siguiente sistema se empleó para aislar el fragmento génico  $\beta$ 1- $\beta$ 2-bisagra de HLA-DR1 humano (que codifica de aa1-198), enlazando la secuencia conectora e insertando los oligonucleótidos que codifican los péptidos antigénicos. Este sistema también se representa en la figura 5 de los dibujos. Se elaboró RNA celular total mediante el procedimiento descrito anteriormente a partir de 3 x 10<sup>6</sup> células BLCL-K68 obtenidas de un individuo homocigótico HLA-DR1. El RNA total se convirtió en cDNA (20  $\mu$ l) usando Superscript-MLV Reverse Transcriptase (GIBCO-BRL) y cebado específico para oligo dT de acuerdo con los procedimientos del fabricante. Las reacciones de PCR iniciales se diseñaron para añadir sitios de restricción necesarios para clonar el fragmento génico  $\beta$ 1- $\beta$ 2-bisagra en vectores de expresión bacterianos (para un trabajo que no es relevante para esta solicitud). Las PCRs se realizaron como se describe anteriormente, excepto que se usaron 5  $\mu$ l del cDNA de molde, los cebadores eran DR1B-F y DR1B-B (las secuencias de esos cebadores indicadas en la figura 8 de los dibujos) y las condiciones de PCR eran 10 ciclos térmicos de 55°C durante 1 minuto, 70°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto, seguidos por 25 ciclos por etapas de 70°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto. El producto de PCR  $\beta$ 1- $\beta$ 2-bisagra (aproximadamente 610 pb) se digirió con *HindIII* y *BamHI*, se purificó en gel y se ligó en JS143.3 digerido con *HindIII/BamHI*, dando como resultado el vector pB712. Este vector (0,5 ng) servía como un molde para amplificaciones por PCR adicionales usando oligonucleótidos BF-NN y BB-S como cebadores. El producto de PCR  $\beta$ 1- $\beta$ 2-bisagra resultante se digirió con *NcoI* y *SpeI*, se purificó en gel y se ligó en pJRS139 digerido con *NcoI/SpeI*, dando como resultado el vector 39B3. Este vector servía como el molde para que la amplificación por PCR añadiera la secuencia conectora y los sitios de restricción y las secuencias de flanco necesarias para la clonación y la expresión en los vectores de expresión de mamífero. Se usó PCR de extensión solapada para mutar un *AflIII* en la región  $\beta$ 1 y añadir la secuencia conectora. El vector 39B3 se

digirió con *Afl*III y *Spe*I y el fragmento génico  $\beta$ 1- $\beta$ 2-bisagra de *Afl*III/*Spe*I se purificó en gel. Dos oligonucleótidos que codifican para el conector y el principio de la región  $\beta$ 1 (OPR121 y OPR122) se reasociaron, se extendieron con DNA polimerasa de *Taq* dando como resultado un fragmento de 78 pb en el que el *Afl*III en la región  $\beta$ 1 se muta sin cambiar el aminoácido especificado. Este fragmento (5 ng) se mezcló con el fragmento génico  $\beta$ 1- $\beta$ 2-bisagra de *Afl*III/*Spe*I (5 ng) y se llevaron a cabo extensiones de solapamiento durante 5 ciclos térmicos de 37°C durante 1 minuto, 70°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto. Después de la adición de los cebadores de PCR OPR119 y OPR123, se llevaron a cabo 5 ciclos térmicos de 37°C durante 1 minuto, 70°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto y 10 ciclos por etapas de 70°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto. El producto de PCR conector- $\beta$ 1- $\beta$ 2-bisagra resultante (aproximadamente 670 pb) contiene un sitio *Eco*RV 5' y un sitio *Eag*I 3' para la clonación entre el intrón líder y el intrón de la región J del vector lanzadera de cadena pesada de IgG (véase la figura 9F de los dibujos). Además, el producto de PCR tiene los sitios de corte y empalme y las secuencias líder de IgG necesarios para la expresión apropiada de la proteína de fusión de MHC-IgG. Para permitir la clonación de las secuencias de péptidos antigénicos, se trató mediante ingeniería un sitio *Afl*III en el extremo de la secuencia de señal y estaba presente un sitio *Nhe*I al principio del conector. Los productos de PCR se digirieron con *Nhe*I y *Eag*I, se purificaron en gel y se ligaron en pB16 digerido con *Nhe*I/*Eag*I (véase anteriormente), para intercambiar los fragmentos génicos de la cadena  $\beta$ . El vector resultante se denominó pBS-DR1 $\beta$ . Para insertar secuencias que codifican los péptidos de unión de HLA-DR1 de clase II, los oligonucleótidos se reasocian y se ligan en pBS-DR1 $\beta$  digerido con *Afl*III/*Nhe*I. El péptido NP 404-415, que tiene la secuencia QISVQPAFSVQ (ID SEC N: 7), es codificado por los oligonucleótidos OPR128 y OPR129, y HA 307-319, que tiene la secuencia PKYVKQNTLKLAT (ID SEC N: 8), es codificado por OPR130 y OPR131. Las secuencias de OPR128, OPR129, OPR130 y OPR131 se indican en la figura 8 de los dibujos. Las construcciones respectivas en la cadena principal de pBS-DR1 $\beta$  se denominan pBS-DR1 $\beta$ /NP y pBS-DR1 $\beta$ /HA. Estos vectores se digieren con *Eco*RV y *Eag*I y el péptido-conector-fragmento génico  $\beta$ 1- $\beta$ 2-bisagra resultante se subclona en el vector lanzadera de IgG pJW009 como se describe en el Ejemplo 2 que sigue.

#### Ejemplo 1E

El siguiente sistema se emplea para aislar el fragmento génico  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2 de I-A<sup>s</sup> (que codifica de aa1 a 182). La figura 8 lista los cebadores oligonucleotídicos usados. La figura 6 de los dibujos también representa el procedimiento. El RNA total se preparó a partir del bazo de un ratón SJL mediante el mismo procedimiento usado para preparar RNA de cultivos celulares. El RNA (10  $\mu$ g) se convirtió en cDNA (50  $\mu$ l) usando MLV Reverse Transcriptase (GIBCO-BRL) y cebado específico para  $\alpha$ 2 de acuerdo con los procedimientos del fabricante. Se realizaron PCRs según se describe anteriormente, excepto que se usaron 6  $\mu$ l del cDNA de molde, los cebadores eran OPR100 y OPR101 (las secuencias de los mismos indicadas en la figura 8 de los dibujos) y las condiciones de PCR eran 5 ciclos térmicos de 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos y 96°C durante 1 minuto, seguidos por 20 ciclos por etapas de 72°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto. El producto de PCR  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2 inicial (aproximadamente 550 pb) se reamplificó usando los cebadores de PCR OPR107 y OPR108 durante 5 ciclos térmicos de 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos y 96°C durante 1 minuto, seguidos por de 10 a 15 ciclos por etapas de 72°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto. El producto de PCR  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2 resultante (aproximadamente 590 pb) contiene un sitio *Eco*RV 5' y un sitio *Eag*I 3' para la clonación entre el intrón líder y el intrón de la región J del vector lanzadera de la cadena kappa de IgG (véase la figura 9C de los dibujos). Además, el producto de PCR tiene los sitios de corte y empalme y las secuencias líder de IgG necesarios para la expresión apropiada de la proteína de fusión de MHC-IgG. Los productos de PCR se digirieron con *Eco*RV y *Eag*I y se purificaron en gel. Los productos de PCR digeridos purificados se ligarán en pA19 digerido con *Eco*RV/*Eag*I (véase anteriormente) para intercambiar las regiones de la cadena  $\alpha$ . El vector resultante, pBS-IAS $\alpha$ , se digiere con *Eco*RV y *Eag*I y el fragmento génico  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2 se subclona en el vector lanzadera de IgG pJW003 según se describe en el Ejemplo 2 que sigue.

#### Ejemplo 1F

Se emplea la siguiente estrategia para aislar el fragmento génico  $\beta$ 1- $\beta$ 2 de I-A<sup>s</sup> (que codifica de aa1 a 189), enlazando la secuencia líder e insertando los oligonucleótidos que codifican los péptidos antigénicos. Este sistema también se representa en la figura 7 de los dibujos. El RNA total de bazo de SJL (10  $\mu$ g) se convirtió en cDNA usando MLV Reverse Transcriptase (GIBCO-BRL) y cebado específico para  $\beta$ 2 de acuerdo con los procedimientos del fabricante. De los 50  $\mu$ l de cDNA generados, 6  $\mu$ l se usaron como DNA de molde para PCR. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe anteriormente, excepto que los cebadores oligonucleotídicos eran VW310 y OPR106 (figura 8) y las condiciones de PCR eran 5 ciclos térmicos de 62°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos y 96°C durante 1 minuto, seguidos por 21 ciclos por etapas de 72°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto. Para añadir las secuencias conectoras, el producto de PCR  $\beta$ 1- $\beta$ 2 inicial (aproximadamente 580 pb) se reamplificó usando los cebadores de PCR VW309 y OPR106 durante 3 ciclos térmicos de 50°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos y 96°C durante 1 minuto, seguidos por 10 ciclos por etapas de 72°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto. Véase la figura 8 para las secuencias de los cebadores VW309 y OPR106. El producto de PCR de enlazador- $\beta$ 1- $\beta$ 2 (aproximadamente 640 pb) se digirió con *Nhe*I y *Eag*I, se purificó en gel y se ligó en pB16 digerido con *Nhe*I/*Eag*I (véase anteriormente), para intercambiar los fragmentos génicos de la cadena  $\beta$ . El vector resultante, denominado pBS-IAS $\beta$  contiene el conector *Eco*RV/*Eag*I -fragmento  $\beta$ 1- $\beta$ 2 necesario para la clonación entre el intrón líder y el intrón de la región J del vector lanzadera de la cadena kappa de IgG (véase la figura 9D de los dibujos). Para insertar secuencias que codifican los péptidos de unión de I-A<sup>s</sup> de clase II, los oligonucleótidos se reasocian y se ligan en pBS-IAS $\beta$  digerido con *Afl*III/*Nhe*I. El péptido MBP 91-103 (HYGSLPQKSQHGR) (ID SEC N: 9) es codificado por los oligo-

nucleótidos VW315 y VW316, PLP 139-151 (HSLGKWLGHDPKF) (ID SEC N°: 10) por VW313 y VW314 y MBP 1-14 (MASQKRPSQRSKYL) (ID SEC N°: 11) por VW317 y VW318. Las secuencias de esos oligonucleótidos se indican en la figura 8 de los dibujos. Las construcciones respectivas en la cadena principal de pBSI- $\text{AS}\beta$  se denominan pBS- $\text{IAS}\beta$ /MBP91, pBS- $\text{IAS}\beta$ /PLO y pBS- $\text{IAS}\beta$ /MBP1. Estos vectores se digieren con *EcoRV* y *EagI* y el péptido-conector-fragmento génico  $\beta$ 1- $\beta$ 2 resultante se subclona en el vector lanzadera de IgG pJW009 como se describe en el Ejemplo 2 que sigue.

## Ejemplo 2

### Preparación del vector de expresión del complejo de fusión del MHC de la invención conectado a inmunoglobulina

El siguiente procedimiento incluye la expresión de moléculas solubles de MHC clase II/inmunoglobulina conectadas a péptido, como proteína quimérica. El objetivo es construir una molécula similar a un anticuerpo que tenga un dominio constante de kappa más la región de la cadena  $\alpha$  de la del MHC clase II y el dominio constante de IgG2b de múrido empalmado a la cadena  $\beta$  del MHC clase II conectada covalentemente a péptidos de interés. Estas construcciones se clonan a continuación en vectores de expresión de mamíferos separados y se usan para transfectar líneas celulares derivadas de linfomas, es decir J558.

Dos vectores de expresión de mamífero usados comúnmente se modificaron de modo que las construcciones quiméricas pudieran clonarse y expresarse. Los vectores originales son descritos por Near y otros, Molecular Immunology 27:901-909 (1990). La figura 10A de los dibujos muestra el vector de expresión de cadena ligera pSVneoKappa 26-10 de 11,7 Kb que contiene pBR322 como cadena principal y el gen de resistencia a la neomicina. Por otra parte, tiene un trozo de 6,7 Kb de DNA de kappa de la línea germinal, que se clonó inicialmente como DNA genómico en lambda. Un fragmento *EcoRI*-*XbaI* de 2,7 Kb contiene el promotor y el estimulador de kappa de Ig, la secuencia líder y su intrón, el exón de la región variable redispuesto con JK1, los restantes exones e intrones de JK, y parte del intrón principal que separa la región variable de la región constante de kappa según se muestra en la figura 11A de los dibujos.

La cadena  $\beta$  conectada a péptido más la región constante de inmunoglobulina IgG2b se ha clonado en pSVgptHC 26-10 denominado pJW010. Este vector celular de mamífero fue descrito originalmente por Mulligan y otros (Science 209:1422-1427, 1980); y más tarde por Near y otros, anteriormente. Brevemente, pSVgptHC 26-10, mostrado en la figura 10B de los dibujos, tiene 10 Kb y contiene el gen de xantina-guanina fosforribosiltransferasa (gpt) de *E. coli* bajo el control del promotor primario de SV40. El dominio constante de IgG2b de múrido de la línea germinal se clonó en pSVgpt como un fragmento *BglII*/*XbaI*. Otro cambio con respecto al vector elaborado por Near y otros, anteriormente, era la clonación de un trozo *EcoRI*-*XbaI* de 0,7 Kb que contiene el promotor/estimulador de la cadena pesada de Ig. Estos cambios dejan al vector pSVptgHC 26-10 con un sitio de clonación *XbaI* que era usado para clonar un fragmento *XbaI* de 1,7 Kb por Near y otros. Este inserto de 1,7 Kb contiene una secuencia líder de la cadena pesada de Ig y su intrón, el exón variable conectado al dominio JH4, y parte del intrón principal que reside entre la región V y la región C. Por otra parte, el fragmento de 1,7 Kb es del DNA de secuencia diana que se ha mutado. En resumen, para efectuar la clonación de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  tienen que completarse varias mutaciones posibles en los fragmentos de 2,7 Kb y 1,7 Kb según se describe posteriormente.

La estrategia para preparar el vector pJW004 para la clonación y la expresión del gen de la cadena  $\alpha$  era elaborar dos mutaciones de sitio dentro del inserto de 2,7 kb y se describe en la figura 11A. Una muestra de pJW004 se ha depositado en la American Type Culture Collection (ATCC), Rockland, Maryland, EE.UU. de A. y ha recibido el número ATCC 75832. Se creó un sitio *EcoRV* en ocho nucleótidos 5' de la región variable de kappa mientras que se añadió un sitio *EagI* en ocho nucleótidos 3' del dominio JK1. Estas mutaciones permitirían la clonación direccional del gen  $\alpha$  del MHC clase II en el vector para la expresión de la molécula de fusión de cadena  $\alpha$ /región constante de kappa. Se usó mutagénesis dirigida al sitio mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para añadir estos dos sitios de restricción, y los cebadores y las etapas llevadas a cabo para hacer estos cambios se muestran en la figura 12 de los dibujos. El trozo de 2,7 kb de DNA se clonó desde pUC19 en M13 mp18 como un fragmento de *EcoRI*-*XbaI* que se linealizó con *EcoRI* y se usó como molde (5 ng/100  $\mu$ l de mezcla) en las reacciones de PCR. El inserto de 2,7 Kb se dividió en tres fragmentos de PCR diseñando cebadores que amplificarían específicamente tres productos de PCR de diferentes longitudes, que incluían un fragmento de *EcoRI* a *EcoRV* de 0,8 Kb, un fragmento de *EcoRV* a *EagI* de 0,4 Kb y un fragmento de *EagI* a *XbaI* de 1,5 Kb. Los cebadores de PCR usados para amplificar cada fragmento se resumen y la secuencia subrayada corresponde al sitio de la endonucleasa de restricción. Se usaron cebadores PMC 120 [5'GCAGAAGAATTCGAGCTCGGCCCCAG3'] (ID SEC N°: 12), que contiene un sitio *EcoRI*, y PMC 108 [5'GATGATATCAGAGAGAAATACATACTAACACAC3'] (ID SEC N°: 13), que contiene un sitio *EcoRV*, para amplificar el producto de 0,4 Kb, mientras que se usaron los cebadores PMC 100 [5'CGGAAGAAAGAGACTTCGGCCGCTACTAC3'] (ID SEC N°: 14), que contiene un sitio *EagI*, y PMC 102 [5'GTGTGTTAGTATGTATTTCTCTCTGATATCTTCAGCTTCCAGCAGTG3'] (ID SEC N°: 15), que contiene un sitio *EcoRV*, para la PCR del fragmento de 0,4 Kb. El trozo final que ha de amplificarse tenía 1,5 Kb de longitud y se amplificó usando los cebadores PMC 99 [5'TCTTCTAGAAGACCACGCTAC3'] (ID SEC N°: 16), que contiene un sitio *XbaI*, y PMC 107 [5'GATGATARCCGGCCGAAGTCTCTTTCTTCCGTTGTC3'] (ID SEC N°: 17), que contiene un sitio *EagI*. Se realizaron dos reacciones de PCR de solapamiento con los tres productos de PCR para construir el inserto de 2,7 Kb mutado. La primera PCR de solapamiento daba como resultado la amplificación de un producto de 1,2 Kb usando los cebadores PMC 100 y PMC 120 y los fragmentos de 0,8 Kb y 0,4 Kb. Se realizó una segunda reacción de PCR de solapamiento usando el DNA de 1,2 Kb purificado en gel y el trozo de 1,5 Kb y los cebadores

PMC 99 y 120. A partir de esta reacción, se produjo un fragmento de 2,7 Kb que posteriormente se digirió con *EcoRI* y *XbaI* y se clonó en pUC19. El DNA de las mezclas de reacción de ligación se transformó en células DG101 y 36 colonias se recogieron y se rastrearon mediante digestos dobles usando las enzimas *EcoRV-EagI*.

Después de detectar varios clones positivos mediante elaboración de mapas de restricción, se eligieron tres clones para la secuenciación. Usando los cebadores PMC 33, 77, 111 y 114 (las secuencias de esos cebadores se indican en la figura 14 de los dibujos), se obtuvieron 900 pb de datos de secuencia. Se encontró que la región donde la secuencia era correcta incluía 400 pb de DNA entre los sitios *EcoRV* y *EagI* y 300 pb 5' del sitio *EcoRV* y 200 pb 3' del sitio *EagI*. Un clon, pJW001, tenía una buena secuencia que era diferente de la secuencia de consenso en 5 bases. Una observación perturbadora hecha después de elaborar el mapa de restricción y de revisar los datos de la secuencia generados usando cebadores universales M13 era que el DNA de inserto clonado en pUC19 y transformado en DG101 se suprimía. Estas secuencias suprimidas planteaban un problema ya que se suprimía mucha maquinaria de transcripción junto con el intrón principal situado entre el sitio *EagI* y *XbaI*. Para salvar el trozo de DNA que contenía los sitios mutados, *EcoRV* y *EagI*, el inserto del clon N° 12 se digirió con dos cortadores únicos, *NcoI* y *BsmI*. El sitio *NcoI* está situado aproximadamente 300 pb 5' del sitio *EcoRV*, y un sitio *BsmI* está presente aproximadamente 200 pb 3' del sitio *EagI*. Por lo tanto, como se observa en la figura 13 de los dibujos, el trozo *NcoI-BsmI* de 0,9 Kb se cortó de pJW001 y se clonó en el inserto pUC19/kappa 26-10 que no tenía los sitios *EcoRV* y *EagI* pero sí tenía los sitios únicos *NcoI* y *BsmI*. Para confirmar que el inserto de tamaño correcto se había clonado en pJW002, se digirió una parte alícuota de DNA de pJW002 con tres pares diferentes de enzimas de restricción, *EcoRI-XbaI*, *NcoI-BsmI* y *EcoRV-EagI*.

Para evitar que se produzcan de nuevo casos de recombinación, la cepa de *E. coli* se cambió de DG101 a XL1-B, un huésped negativo a recA. En esta etapa, el DNA del inserto contenía las dos mutaciones de sitio y la clonación del gen  $\alpha$  del MHC clase II podía proceder.

El DNA de pJW002 se digirió con *EcoRV* y *EagI*, se desfosforiló con fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIAP) y a continuación se purificó en gel. El DNA de vector aislado se usó a continuación en ligaciones con el gen I-A<sup>d</sup> de la cadena  $\alpha$  cortado con *EcoRV-EagI* de 577 pb purificado en gel. La ligación, la transformación y el rastreo de 10 colonias daban un solo clon positivo que se digería con dos pares de enzimas, *EcoRI-XbaI* y *EcoRV-EagI*. El clon positivo, pJW003 (kappa mutada con pUC19 que contiene el gen  $\alpha$ ), se hizo crecer y el DNA se purificó con Qiagen.

Se realizó un digesto triple de DNA de pJW003 usando *EcoRI*, *XbaI* y *HindIII*. El DNA cortado se trató a continuación con fenol-cloroformo, se precipitó con etanol y se lavó con etanol al 70% después de lo cual el DNA se digirió con *ScaI* y se trató con CIAP. El DNA de pUC19 migra en 2,7 Kb sobre un gel de agarosa, lo que hace difícil separar pUC del DNA del inserto deseado. Sin embargo, pUC19 tiene un sitio *ScaI* único que corta y da dos fragmentos de tamaño inferior que pueden separarse en un gel de agarosa del DNA del inserto de 2,9 Kb. Después de la purificación en gel, el inserto del gen I-A<sup>d</sup> de  $\alpha$  de 2,9 Kb se ligó en vector pSVneo purificado en gel con *EcoRI-XbaI* para elaborar pJW004 (figura 16A). Las ligaciones se transformaron en DG103. Se realizaron maxi-preparaciones de Qiagen para aislar grandes cantidades de DNA de vector de modo que el pJW004 pudiera transfectarse en células de mamífero.

La estrategia para clonar el gen variable  $\beta$  de MHC en el vector de expresión pSVgpt era elaborar cuatro mutaciones dentro del trozo *XbaI* de 1,7 Kb descrito en la figura 11B. Las cuatro mutaciones incluían dos delecciones de sitio *EcoRV*, una situada 68 nucleótidos 5' del exón de la secuencia líder y el otro sitio situado 27 nucleótidos 5' de la región variable. Las otras dos mutaciones eran adiciones de sitio e implicaban un sitio *EcoRV* ocho nucleótidos 5' de la región variable y un sitio *EagI* ocho nucleótidos 3' del dominio JH4. Se usó mutagénesis dirigida al sitio de M13 para elaborar las mutaciones en el inserto de 1,7 Kb. El sistema era subclonar el fragmento *XbaI* de 1,7 Kb de pSVgptHC26-10 y clonarlo en M13. Se realizó mutagénesis dirigida al sitio usando the BioRad Muta-Gene *in vitro* Mutagenesis Kit que se basa en el método altamente eficaz y simple de Kunkel. Este método emplea una cepa de *E. coli* especial que es deficiente para dUTPasa (dut) y uracil-N-glicosilasa (ung). Estas deficiencias permiten sustituciones aleatorias de timina por uracilo en el ssDNA de M13. Cuando el DNA de doble hebra, o la forma replicativa (RF), se transforma de nuevo en una cepa huésped de tipo salvaje, la uracil-N-glicosilasa degrada los uracilos presentes en el molde original de modo que sólo la hebra de DNA que tiene la mutación específica de sitio se replica generando de ese modo una alta eficacia de clones positivos.

Las etapas empleadas para elaborar las mutaciones se muestran en la figura 16. Brevemente, se usó el cebador PMC 26 [5'CAGGGTGATC AACACCCTGAAAAC3'] (ID SEC N°: 18) para suprimir el sitio *EcoRV* situado 68 nucleótidos 5' del exón de la secuencia líder, y contenía un solo cambio de base, indicado por el nucleótido subrayado, de A por T. La supresión del segundo sitio *EcoRV* 27 nucleótidos 5' de la región variable se realizó con el cebador PMC 28 [5'GTCACAGTTATCCACTCTGTC3'] (ID SEC N°: 19) y de nuevo era un cambio de mutación puntual simple de A por T. El cebador PMC 96 [5'CCGTCTCCTCAGGTACGGCCGGCCTCTCCAGGTCTTCG3'] (ID SEC N°: 20) contenía la mutación del sitio *EagI*, que consistía en cuatro cambios de bases indicados por los nucleótidos subrayados. Finalmente, el cebador PMC 97 [5'CACAGTTATCCACTCTGTCTTTGATATCACAGGTGTCCT3'] (ID SEC N°: 21) se usó para crear el sitio *EcoRV* cambiando cuatro nucleótidos según se muestra.

El inserto de 1,7 Kb mutado se digirió a continuación con *EcoRV-EagI*, se trató con CIAP, se purificó en gel y se usó en ligaciones con el gen  $\beta$  del MHC clase II purificado en gel, cortado con *EcoRV-EagI*. Otras variantes, tales como Ova 323-339/fragmento génico  $\beta$ 1- $\beta$ 2 de I-A<sup>d</sup> descrita en el Ejemplo 1 anteriormente, también se clonaron en

el sitio *EcoRV-EagI* y se hicieron crecer en M13. La figura 15 de los dibujos describe la estrategia para clonar la variable  $\beta$  del MHC clase II y variantes en el vector pJW009. Después de clonar en pJW009, el DNA se digirió con *XbaI* para separar los fragmentos de *XbaI* que contienen los diversos genes variables de  $\beta$  conectados a péptido y se subclonó en el vector de expresión de mamífero pJW010 según se muestra en la figura 16B. Puesto que no era posible la clonación direccional, se realizó el rastreo de clones positivos digiriendo con *EcoRI-EcoRV*. Se han aislado clones positivos que contienen los genes  $\beta$  y otras variantes de la cadena  $\beta$  conectadas a péptidos y el DNA se ha purificado con Qiagen. Estos se han denominado pHB27, pHB310, pHB412 y pHB58 para la construcción de la cadena  $\beta$  de I-A<sup>d</sup> que no contiene péptido, o que contiene el péptido Ova 323-339, el péptido Ova:H331R y el péptido Ova:A331Y, respectivamente (véase el Ejemplo 1B). Se han depositado muestras de pHB27, pHB310, pHB412 y pHB58 en the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, EE.UU. de A. y han recibido los números ATCC 75833, 75835, 75836 y 75834, respectivamente.

La transfección de células derivadas de linfoma tales como células J558 y NSO puede hacerse esencialmente como se describe por Near y otros. Pueden co-transfectarse 20  $\mu$ g tanto de pJW004 como de pJW010 en células J558 o NSO mediante electroporación usando el impulsor génico BioRad. Se seleccionan líneas celulares estables en de 7 a 10 días. La expresión de la molécula quimérica de MHC claseII/Ig de la invención se determina mediante un ELISA específico para detectar la región constante de IgG2b de murino y/o puede realizarse un análisis por transferencia Western. Finalmente, la proteína expresada se purifica mediante cromatografía de afinidad de Proteína A o G.

### Ejemplo 3

*Construcción de los vectores de expresión del MHC conectados a péptido, de longitud completa, de la invención y vectores de expresión para factores co-estimulantes (B7-1 y B7-2)*

Se construyen adecuadamente vectores capaces de co-expresar las moléculas de la cadena  $\alpha$  de I-A<sup>d</sup> de longitud completa y la cadena  $\beta$  de I-A<sup>d</sup> conectada a péptido mediante los procedimientos esbozados en la figura 17 de los dibujos. Para aislar la cadena  $\alpha$  de I-A<sup>d</sup> de longitud completa, se convirtió RNA total de A20 (5  $\mu$ g) en cDNA usando Superscript-MLV Reverse Transcriptase (GIBCO-BRL) y cebado específico para TM de la cadena  $\alpha$  de acuerdo con los procedimientos del fabricante. Este cDNA se usó como el molde para la amplificación por PCR usando un cebador OPR136 específico para el líder de la cadena  $\alpha$  (la secuencia de ese cebador se indica en la figura 8) y un cebador OPR139 específico para TM de la cadena  $\alpha$  (la secuencia de ese cebador se indica en la figura 8) mediante las condiciones de PCR descritas en el Ejemplo 1 anterior. El producto de PCR resultante tiene aproximadamente 800 pb y contiene un sitio *XmaI* 5' y un sitio *EcoRI* 3' para la clonación entre el promotor de CMV y sitios poli-A de SV40 del vector de expresión de mamífero PEE13 (Celltech). Además, este fragmento tiene una secuencia de consenso de Kozak para la iniciación eficaz de la traducción (véase la figura 18A de los dibujos). El producto de PCR se digirió con *XmaI* y *EcoRI*, se purificó en gel y se ligó en PEE13 digerido con *XmaI/EcoRI*, para dar el vector PEE-IA<sup>d</sup> $\alpha$ . El fragmento de cadena  $\beta$  conectado a péptido, de longitud completa, se construyó insertando las secuencias líder y TM en los vectores péptido Ova 323-339 y HEL 74-86-conector- $\beta$ 1- $\beta$ 2 (pB16 y pB4, respectivamente), descritos en el Ejemplo 1 anteriormente. Se convirtió RNA total de A20 (5  $\mu$ g) en cDNA usando Superscript-MLV Reverse Transcriptase (GIBCO-BRL) y cebado específico para oligo dT o específico para TM de la cadena  $\beta$  de acuerdo con los procedimientos del fabricante. Estos cDNAs se usaron como el molde para amplificaciones por PCR usando un par de cebadores específicos para el líder de la cadena  $\beta$  (OPR132/OPR133) (las secuencias de esos cebadores se indican en la figura 8 de los dibujos) o un par de cebadores específicos para TM de la cadena  $\beta$  (OPR134/OPR135) (las secuencias de esos cebadores se indican en la figura 8 de los dibujos). El producto de PCR líder de  $\beta$  de 100 pb contiene sitios *HindIII* y *XmaI* 5' y un sitio *AflIII* 3' para clonar en los vectores péptido pBC1 y pB16-conector- $\beta$ 1- $\beta$ 2. La inclusión del sitio *AflIII* cambia los dos últimos aminoácidos del líder de la cadena  $\beta$  de I-A<sup>d</sup> por los encontrados en el líder de IgG. El producto de PCR del líder de  $\beta$  se digirió con *HindIII* y *XmaI*, se purificó en gel y se ligó en pB16 digerido con *HindIII/AflIII*, para dar pDM21. El producto de PCR de TM de  $\beta$  de 180 pb contiene un sitio *BstXI* 5' y sitios *XmaIII* y *EcoRI* 3' para clonar en pDM21. El producto de PCR de TM de  $\beta$  se digirió con *BstXI* y *EcoRI*, se purificó en gel y se ligó en pDM21 digerido con *BstXI/EcoRI*, para dar el vector pIA<sup>d</sup> $\beta$ /OVA, pVW229. El oligonucleótido del péptido Ova se intercambió con el oligonucleótido del péptido HEL descrito en el Ejemplo 1 anteriormente para generar el vector pIA<sup>d</sup> $\beta$ /HEL. Estos vectores se digirieron con *XmaI* y *EcoRI* para generar los fragmentos génicos de la cadena  $\beta$  conectados a péptido, de longitud completa, para la clonación entre el promotor de CMV y sitios poli-A de SV40 del vector de expresión de mamífero PEE6 (Celltech). Estos fragmentos también tienen la secuencia de consenso Kozak para la iniciación eficaz de la traducción (figura 18B). Los vectores resultantes PEE-IA<sup>d</sup> $\beta$ /OVA y PEE-IA<sup>d</sup> $\beta$ /HEL se digirieron con *BglIII* y *BamHI*. Los fragmentos de promotor de CKMB/péptido-cadena  $\beta$  se purificaron en gel y se ligaron en PEE-IA<sup>d</sup> $\alpha$  digerido con *BamHI*, para generar los vectores de expresión finales PEE-IA<sup>d</sup>/OVA y PEE-IA<sup>d</sup>/HEL. También se construyó y usó como control un vector sin ningún oligonucleótido peptídico, PEE-IA<sup>d</sup>.

Para clonar los genes B7-1 y B7-2, pueden generarse cDNAs a partir de RNA total aislado de células de bazo de ratón activadas o de líneas de células de linfoma de ratón. Estos cDNAs sirven como moldes para la amplificación por PCR usando cebadores específicos para B7-1 o B7-2. Los productos de PCR generados tienen sitios *NotI* 5' y 3' para la clonación entre el promotor de CMV y sitios poli-A de SV40 de vector de expresión de mamífero pCMV $\beta$  (Clontech). Estos fragmentos también tienen la secuencia de consenso Kozak para la iniciación eficaz de la traducción.

## Ejemplo 4-11

*Ensayos y Métodos de la Invención*5 *Comentarios Generales*

Se emplean adecuadamente uno o más de varios sistemas de ensayo para probar la capacidad de los complejos de fusión del MHC solubles de la invención para modular la actividad de células T y se ejemplifican en los ejemplos que siguen. Se sabe que en un primer ensayo ejemplar, una molécula de fusión de I-A<sup>d</sup> del MHC clase II/Ig de ratón se conecta a un péptido antigénico de lisozima de huevo de gallina (HEL 74-86), ovalbúmina de pollo (Ova 323-339) o uno de dos análogos de una sola sustitución del péptido Ova-Ova H331R u Ova A332Y. Los péptidos HEL 75-86, Ova 323-339 y Ova H331R se unen a I-A<sup>d</sup> mientras que el análogo Ova 332Y servirá como un control de ausencia de unión [Buus, S. y otros (1987) *Science* 235: 1353-1358; Sette, A. y otros (1987) *Nature* 328:395-399]. Se cree que la His<sub>331</sub> no es importante para la unión al MHC pero es crítica para la estimulación de células T y el complejo Ova H331R/I-A<sup>d</sup>/Ig servirá como un antagonista de TcR para la estimulación de células T. El hibridoma de células T DO 11.10 de ratón reconoce específicamente el complejo Ova 323-339/I-A<sup>d</sup> y se estimula para producir IL-2. El ensayo, esbozado en el Ejemplo 4 posterior, usa el Ova 323-339/I-A<sup>d</sup>/Ig soluble para suprimir la estimulación de células T por APCs cargadas con el péptido Ova. Efectos adicionales de las moléculas solubles de MHC conectado a péptido/Ig sobre la proliferación de células T específicas para Ova se examinan en el Ejemplo 5. Además, los efectos del Ova 323-339/I-A<sup>d</sup>/Ig soluble y HEL-74-86/I-A<sup>d</sup>/Ig soluble sobre la función de células T *in vivo* pueden examinarse como se describe en los Ejemplos 6 y 7. Los ratones se inyectan con los péptidos antigénicos HEL y Ova (conectados al portador KLH) y las moléculas Ova 323-339/I-A<sup>d</sup>/Ig soluble o HEL 74-86/I-A<sup>d</sup>/Ig soluble. La inhibición de respuestas de anticuerpos dependientes de células T *in vivo* y la proliferación de células T específicas para Ova y células T específicas para HEL se caracterizarán como se describe en los Ejemplos 6 y 7.

Un modelo adicional se ejemplifica mediante un ensayo que implica conectar un péptido de la nucleoproteína de la influenza (NP 404-415) a las moléculas humanas de HLA-DR1 de clase II/Ig (véase el Ejemplo 5). Las moléculas NP 404-415/DR1/Ig solubles se analizan con respecto a su capacidad para inhibir la proliferación dependiente de APC/NP 404-415 de una línea de células T humanas, K68-36. Las moléculas de DR1/Ig solubles conectadas a un péptido que se une a HLA-DR1 diferente (HA 307-319) se usan como un control negativo.

En un sistema modélico adicional, se examina la capacidad de moléculas solubles del MHC conectado a péptido/Ig para suprimir la autoinmunidad. Como un modelo animal para la esclerosis múltiple, los ratones SJL pueden inducirse para que desarrollen encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) después de la inmunización con proteínas o péptidos encefalitogénicos o después de la transferencia adoptiva de células T<sub>H</sub> específicas para estos antígenos. Según se describe posteriormente, las regiones encefalitogénicas de la proteína básica de la mielina (MBP 91-103) y de la proteolipoproteína (PLP 139-151) están conectadas cada una a la molécula de I-A<sup>s</sup> de clase II/Ig de ratón. El péptido MBP 1-14 que no se une sirve como un control negativo. Las moléculas solubles de I-A<sup>s</sup> conectado a péptido/Ig se administran a ratones inducidos para la EAE. La capacidad para reducir la incidencia y la gravedad de la EAE se determina según se describe en el Ejemplo 8 que sigue. Además, los efectos inmunosupresores de análogos de PLP antagonistas de TcR conectados a moléculas I-A<sup>s</sup> de longitud total en ratones inducidos hacia la EAE pueden examinarse en este sistema. Los complejos de péptido/MHC se producirán en el músculo después de la inyección con DNA que tiene las construcciones génicas apropiadas, según se describe en el Ejemplo 11 que sigue.

45 *Ejemplo 4**Efectos de las moléculas solubles de MHC ligado a péptido/Ig en un sistema de hibridoma de células T específicas para ovalbúmina*

Un ensayo de acuerdo con la invención implica el uso de un hibridoma de células T de múrido, DO 11.10 [Shimonkevitz, R. y otros (1983) *J. Exp. Med.* 158:303] que expresa sobre su superficie un receptor de células T específico para un fragmento peptídico de 21 aminoácidos (aa 323-339) derivado de ovalbúmina de huevo de pollo (Ova). Este péptido puede presentarse a DO 11.10 sólo mediante células que presentan antígeno (APC) que expresan la molécula de MHC clase II de múrido I-A<sup>d</sup>. Cuando el péptido es presentado por la APC apropiada, las células DO 11.10 responden produciendo IL-2, que puede ensayarse a continuación como una medida de la activación de células T. La línea celular a emplear para presentar el antígeno es A20.1-11 [Kim, K. y otros (1979) *J. Immunol.* 122: 549], que expresa I-A<sup>d</sup> sólo en su superficie. Brevemente, las células A20.1-11 se incuban en presencia del fragmento peptídico hasta que sus moléculas de I-A<sup>d</sup> se saturan (aproximadamente 3 horas) con péptido y a continuación se lavan para retirar el péptido no unido. Las células DO 11.10 se incuban con o sin las moléculas solubles de MHC conectado a péptido/Ig durante 3 horas (o más) y a continuación se lavan intensamente para retirar la proteína no unida. Según se describe en el Ejemplo 1 anterior, los péptidos conectados a la cadena β de I-A<sup>d</sup> incluyen Ova 323-339, uno de dos análogos de una sola sustitución del péptido Ova-Ova H331R u Ova 332Y, o un péptido de lisozima de huevo de gallina (HEL 74-86). Se sabe que los péptidos Ova 323-339, Ova H331R, HEL 74-86 se unen a I-A<sup>d</sup> mientras que el análogo Ova A332Y servirá como un control que no se une [Buus, S. y otros (1987) *Science* 235: 1353-1358; Sette, A. y otros (1987) *Nature* 328:395-399]. El péptido HEL 74-86 sirve como un control negativo no específico. APC impulsadas por antígenos se incuban a continuación con el hibridoma de células T DO 11.10 tratado (2 x 10<sup>5</sup>/pocillo) durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Los cultivos se llevan a cabo en medio de cultivo completo (RPMI 1640

## ES 2 152 424 T5

complementado con FBS al 10%, penicilina/estreptomicina, L-glutamina y 2-mercaptoetanol  $5 \times 10^5$  M) en placas de microvaloración de fondo plano de 96 pocillos. Después de 24 horas, el sobrenadante de cultivo se ensaya con respecto a la presencia de ELISA usando la línea de células T de múrido dependiente de IL-2, CTLL-2.

5 Se preparan varias diluciones de dos veces de cada sobrenadante de cultivo en medio completado en placas de microvaloración de fondo plano y se añaden  $1 \times 10^4$  células CTLL-2 a cada pocillo. Después de 16 a 20 horas los pocillos de control negativos (CTLL-2 cultivadas con medio sólo) y los pocillos de control positivos (células CTLL-2 cultivadas con rIL-2) se examinan microscópicamente y, en el punto en el que las células de control negativo están muertas en un 90%, mientras las células de control positivo todavía proliferan activamente, se añade MTT (2 mg/ml; 10 25  $\mu$ l/pocillo) y las placas se devuelven a la incubadora durante 4 horas adicionales. En este momento, los cristales azules formados por MTT en células que se metabolizan activamente se disolverán mediante la adición de 150  $\mu$ l por pocillo de HCl 0,4 N en isopropanol por pocillo. Después de la mezcladura cuidadosa, se determina la D.O. a 562 nm usando un lector de placas de ELISA (Ceres-UV900HI). La concentración de IL-2 en pocillos experimentales puede determinarse mediante extrapolación de una curva estándar de IL-2 y a continuación puede compararse la IL-2 15 de cultivos que no contienen proteína recombinante con aquéllos que contienen las moléculas que han de probarse y puede calcularse un índice de inhibición.

Se cree que se prefiere el uso de una dosis de antígeno y números de APC que dan respuestas ligeramente submáximas de antígeno peptídico y células que presentan antígeno para la activación de DO 11.10 para detectar la inhibición del sistema por moléculas de proteínas recombinantes. En vista de lo mismo, los experimentos, preferiblemente, se efectúan al menos inicialmente con condiciones de impulsos de antígeno peptídico de 100  $\mu$ g/ml y 10  $\mu$ g/ml y con concentraciones de APC de  $0,5 \times 10^5$ /pocillo y  $0,1 \times 10^5$ /pocillo. 20

Moléculas solubles de MHC conectado a péptido/Ig se prueban con respecto a su capacidad para bloquear este sistema a lo largo de un intervalo de concentraciones de  $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M. La prueba se realiza adecuadamente con una relación molar de aproximadamente 10:1 a 1:1 entre las moléculas solubles de MHC conectado a péptido/Ig y el MHC Clase II expresado sobre  $0,5 \times 10^5$  ó  $0,1 \times 10^5$  células A20.1-11. Las concentraciones se ajustan según sea necesario dependiendo de los resultados de experimentos preliminares. Una disminución en la producción de IL-2 de DO 11.10 después de la preincubación con las moléculas solubles Ova 323-339/I-A<sup>d</sup>/Ig u Ova H331R/I-A<sup>d</sup>/Ig en comparación 30 con la preincubación con moléculas de Ova A332Y/I-A<sup>d</sup>/Ig o HEL 74-86/I-A<sup>d</sup> o sin preincubación indicará que las moléculas solubles de MHC conectado a péptido pueden suprimir las respuestas inmunitarias de una manera específica para el péptido.

Este mismo ensayo también puede usarse para identificar péptidos que funcionan como un antagonista o un agonista parcial de TcR según se analiza anteriormente. 35

### Ejemplo 5

40 *Efectos de moléculas solubles de MHC conectado a péptido/Ig sobre la proliferación de células T estimulada por antígeno*

Un ensayo adicional de acuerdo con la invención examina si las moléculas solubles de MHC conectado a péptido/Ig son capaces de suprimir respuestas inmunitarias en células T aisladas de ratones o seres humanos (en vez del hibridoma de células T descrito en el Ejemplo 4 anterior). 45

El hibridoma de células T DO 11.10 está parcialmente activado y no requiere señales co-estimulantes para la activación completa. Por otra parte, las células T<sub>H</sub> no transformadas aisladas de ratones inmunizados requieren tanto una señal de péptido/MHC como señales co-estimulantes para proliferar en cultivo. Este sistema se usará como una medida sensible de los efectos de las moléculas solubles de MHC conectado a péptido/Ig sobre respuestas de células T<sub>H</sub>. Se obtendrán células T cebadas con Ova a partir de ratones BALB/c (MHC Clase II: I-A<sup>d</sup>) inmunizando con 50  $\mu$ g de Ova 323-339-KLH en adyuvante completo de Freund, subcutáneamente en la base de la cola. Se realizarán dos inmunizaciones a intervalos de 7 días y, una semana después de la segunda inyección, los ratones se sacrificarán y los nódulos linfáticos inguinales y paraaórticos se retirarán y se convertirán en una suspensión de células simples. 55

La suspensión se agota de células que presentan antígeno mediante incubación sobre lana de nailon y columnas Spheadex G-10, y las poblaciones de células T resultantes se incuban con medio de Click solo o con moléculas solubles de MHC conectado a péptido/Ig disueltas en medio de Click. Las células T se cultivan con las moléculas solubles de MHC conectado a péptido/Ig (según se describe en el Ejemplo 4 anteriormente) durante 3 horas antes del lavado y la iniciación del ensayo de proliferación, sin embargo este período de tiempo puede incrementarse hasta 24 horas si es necesario. 60

Se usan células B activadas de ratones BALB/c como células que presentan antígeno en el ensayo de proliferación. Las células B se preparan cultivando células de bazo con 50  $\mu$ g/ml de LPS durante 48 y 72 horas, tiempo en el cual las células activadas se aislarán mediante centrifugación con gradiente de densidad sobre Lymphoprep. Las células B activadas se someten a continuación a impulsos con péptido de ovalbúmina durante 3 horas, se lavan intensivamente, se fijan con paraformaldehído para inhibir la proliferación de células B, y se añaden a células T purificadas. 65

El ensayo de proliferación se lleva a cabo en placas de microvaloración de fondo redondo de 96 pocillos a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%, durante 3-5 días. Los pocillos se someten a impulsos con 1  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-timidina durante 18 horas antes de la terminación de los cultivos y se recogen usando un recogedor de células Skatron. La incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en DNA como una medida de la proliferación de células T se determina usando un espectrómetro de centelleo de líquidos

- 5 LKB. Una disminución en la proliferación de células T después de la preincubación con las moléculas solubles Ova 323-339/I-A<sup>d</sup>/Ig, en comparación con la preincubación con moléculas Ova A332Y/I-A<sup>d</sup>/Ig o HEL 74-86/I-A<sup>d</sup>/Ig o sin preincubación, indica que las moléculas solubles de MHC conectado a péptido/Ig pueden suprimir respuestas inmunitarias de una manera específica para el péptido.
- 10 La medida de las concentraciones de IL-2 en pocillos que contienen células T que proliferan a las 24 y 48 horas puede ser una buena alternativa para llevar a cabo el ensayo de proliferación de 3 a 5 días. Experimentos iniciales implican la comparación de estos dos sistemas para determinar qué sería más sensible para la detección de la inhibición. Debido a que la detección de IL-2 mide un caso de activación previo, puede resultar ser más útil en esta situación.
- 15 Experimentos iniciales llevados a cabo antes de la prueba de las moléculas solubles de MHC conectado a péptido determinar los parámetros óptimos para estos sistemas, es decir, las concentraciones supramáxima, máxima y submáxima de antígeno peptídico para someter a impulsos células que presentan antígeno, las dosificaciones óptima y subóptima de APC/pocillo, y la duración óptima del ensayo de proliferación (3-5 días) o el ensayo de producción de IL-2. Según se analiza anteriormente, se cree que el sistema será más sensible a la inhibición con proteínas recombinantes a un nivel subóptimo de activación de células T, de modo que se eligen preferiblemente tales condiciones para los experimentos iniciales.

- 25 También se examinarán los efectos de moléculas solubles de MHC de clase II humano conectado a péptido/Ig sobre la proliferación de células T humanas estimuladas por antígeno. Pueden producirse moléculas solubles de HLA-DR1/Ig enlazadas covalentemente a la proteína nuclear de influenza NP 404-415 o la proteína de hemaglutinina de influenza HA 307-318 según se describe en los Ejemplos 1 y 2 anteriormente. Se sabe que ambos péptidos se unen a las moléculas de HLA-DR1. Un clon de células T humanas específico para NP 404-415/DR1, K68-36, se usará para probar los efectos de la preincubación de las moléculas solubles de MHC conectado a péptido/Ig sobre la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina estimulada por APCs cargadas con NP 404-415 (células BLCL-K68; células B transformadas con EBV del mismo donante), según se describe anteriormente. De nuevo una disminución en la proliferación de células T después de la preincubación con las moléculas solubles de NP 404-415/DR1/Ig, en comparación con la preincubación con moléculas de HA 307-318/DR1/Ig o sin preincubación, indicará que las moléculas solubles de MHC conectado a péptido/Ig pueden suprimir respuestas inmunitarias humanas de una manera específica del péptido.
- 30
- 35 Estos ensayos también pueden emplearse para indicar si un péptido puede funcionar como un antagonista o un agonista parcial de TcR según se analiza anteriormente.

#### Ejemplo 6

- 40 *Efectos in vivo de las moléculas solubles de MHC conectado a péptido sobre respuestas de anticuerpos*

- 45 Según se analiza anteriormente, se ha observado que los complejos de péptido-MHC sobre la superficie de APCs sólo inducirán la expansión clonal de una línea de células T reactivas específica para el péptido unido al MHC si las APCs también aportan señales co-estimulantes. En ausencia de señales co-estimulantes aportadas por las APCs, estas células T<sub>H</sub> reactivas particulares inducirán un estado de anergia.

- 50 Para probar si las moléculas solubles de MHC conectado a péptido/Ig pueden inducir anergia de células T<sub>H</sub> *in vivo*, pueden examinarse los efectos de tales moléculas sobre el cambio de la clase de inmunoglobulina dependiente de células T<sub>H</sub> (es decir de IgM a IgG) y sobre la expansión clonal de líneas de células T específicas para el péptido (Ejemplo 7 que sigue).

Para examinar el cambio de la clase de Ig, se establecen tres grupos de prueba como sigue:

- 55 (a) 15 ratones BALB/c son inyectados intraperitonealmente (IP) con 10-100  $\mu$ g de conjugado de Ova 323-339-KLH, en adyuvante completo de Freund, para inducir una respuesta inmunitaria al péptido Ova 323-339. El día antes y el día de la inmunización con Ova-KLH, 5 de los ratones son inyectados IP con 10-100  $\mu$ g de Ova 323-339/MHC-I-A<sup>d</sup> soluble, en PBS. Esta proteína de fusión soluble de Ova se une al receptor de células T (TCR) presentado sobre las células T<sub>H</sub> específicas para Ova 323-339. Debido a la ausencia de la señal co-estimulante, estas células T<sub>H</sub> son inducidas a un estado de anergia. Los 10 ratones restantes sirven como control. 5 de ellos reciben PBS y otros 5 reciben MHC I-A<sup>d</sup>/Ig intraperitonealmente.
- 60
- (b) Se realizan experimentos idénticos con conjugado de HEL-KLH y HEL 74-86/MHC I-A<sup>d</sup>/Ig.
- 65 (c) Se inyectan 25 ratones BALB/c como se describe anteriormente con conjugados de Ova-KLH y HEL-KLH. 5 de estos ratones son inyectados intraperitonealmente con Ova 323-339/MHC I-A<sup>d</sup>/Ig y 5 de ellos recibirán HEL 74-86/MHC I-A<sup>d</sup>/Ig intraperitonealmente. Los otros ratones reciben PBS o MHC I-A<sup>d</sup>/Ig como controles.

Diez días después de la inmunización, se recoge sangre de cada ratón mediante sangrado de la cola. Los ratones son anestesiados con metafino de la siguiente manera: algodón o gasa se humedece con de 20 a 25 gotas de metafino y se coloca en un recipiente de vidrio con una tapa de metal o vidrio. El ratón se pone en la parte superior de una rejilla que está sobre el algodón o la gasa humedecidos. Cuando la respiración se frena, el ratón se retira de la cámara y los dedos se pellizcan para comprobar los reflejos. Una vez que el ratón está suficientemente anestesiado, la cola se mantiene bajo una lámpara térmica para incrementar el flujo sanguíneo. Después de desinfectar la cola con alcohol isopropílico o etílico, la punta se corta con unas tijeras afiladas. La sangre se recoge en un tubo de Eppendorf. El sangrado puede mejorarse “ordeñando” la cola. Después de recoger la sangre, se aplica presión a la punta de la cola con un taco de gasa. La sangre se centrifuga a aproximadamente 14.000 g durante 3-5 minutos y el suero se recoge.

Los ensayos se realizan en placas de microvaloración de 96 pocillos (Maxisorp F8; Nunc, Inc.) revestidas en 1-50  $\mu\text{g/ml}$  con OVA-KLH u ovalbúmina entera usando un tampón de revestimiento de Tris-HCl, pH 8,5. Un segundo grupo de placas se reviste con 1-50  $\mu\text{g/ml}$  de HEL-KLH o HEL entera. Las placas se cubren con película piezosensible (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, CA) y se incuban durante la noche a 4°C. Las placas se lavan a continuación con solución de lavado (Imidazol/NaCl/Tween-20 al 0,4%) y se bloquean añadiendo 100  $\mu\text{l/pocillo}$  de una solución de BSA al 3%. Después de la incubación sobre un rotador de placas a temperatura ambiente durante 30 minutos, las placas se lavan 5 veces con solución de lavado. Los sueros de ratón se diluyen 1:500 en diluyente de muestra/conjugado (gelatina al 2% + Tween-20 al 0,1% en PBS) y a continuación, por duplicado, se diluyen en serie sobre la placa. Se establecen dos placas idénticas para cada proteína de revestimiento, una para la determinación de la concentración de IgM y la otra para IgG. Después de la incubación sobre un rotador de placas a temperatura ambiente durante 30 minutos, las placas se lavan 5 veces con solución de lavado. Se añaden a las placas apropiadas conjugados de anti-(IgM de ratón) de cabra-HRP y anti-(IgG de ratón) de cabra-HRP (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, dilución 1:100 en diluyente de muestra/conjugado). Después de la incubación sobre un rotador de placas a temperatura ambiente durante 30 minutos, las placas se lavan 5 veces con solución de lavado y a continuación se incuban con 100  $\mu\text{l/pocillo}$  de sustrato de desarrollo ABTS (Kirkgaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) durante 10 minutos sobre un rotador de placas a temperatura ambiente. Las reacciones se detienen con 100  $\mu\text{l/pocillo}$  de tampón de Quench (Kirkgaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) y el valor de la absorbancia se lee a 405 nm usando un lector de ELISA de placas de microvaloración automatizado (Ceres UV900HI, Biotek, Winooski, Vermont). La concentración se determina representando la lectura de la absorbancia frente al logaritmo de las diluciones de las muestras y determinando la dilución del punto medio (50%) de la absorbancia. Se comparan a continuación las valoraciones para IgM frente a IgG. Los sueros también se controlan con respecto a la reactividad cruzada.

### Ejemplo 7

#### *Estimulación de células $T_H$ en ratones tratados con moléculas solubles de MHC conectado a péptido/Ig*

Pueden examinarse adecuadamente los efectos de moléculas solubles de MHC conectado a péptido/Ig sobre la expansión clonal de líneas de células T específicas para péptido *in vivo* de acuerdo con el siguiente ensayo.

Los grupos de tratamiento (4 ratones por grupo) son idénticos a los descritos en el Ejemplo 6 anteriormente. El procedimiento de inmunización es como sigue: Los ratones son inyectados intraperitonealmente con 10-100  $\mu\text{g}$  del Ova 323-339/MHC I-A<sup>d</sup>/Ig soluble, en PBS, y 24 horas más tarde son inyectados subcutáneamente en la base de la cola con 50  $\mu\text{g}$  de Ova 323-339-KLH. Estas dos inyecciones se repiten 6 y 7 días más tarde. Siete días después de la terminación del segundo grupo de inyecciones, los ratones son sacrificados. Los nódulos linfáticos inguinales y paraaórticos se extirpan y se convierten en una suspensión de células simples.

La suspensión se agota de células que presentan antígeno mediante incubación sobre lana de nailon y columnas Sephadex G-10, y las poblaciones de células T purificadas resultantes se incuban con APCs sometidas a impulsos con el péptido Ova 323-339 o el péptido HEL 74-86.

Se usan células B activadas de ratones BALB/c en células que presentan antígeno en el ensayo de proliferación. Las células B se preparan cultivando células de bazo con 50  $\mu\text{g/ml}$  de LPS durante de 48 a 72 horas, tiempo en el cual las células activadas se aíslan mediante centrifugación con gradiente de densidad sobre Lymphoprep. Las células B activadas se someten a continuación a impulsos con el péptido Ova 323-339 o el péptido HEL 74-86 durante 3 horas, se lavan intensivamente, se fijan con paraformaldehído para inhibir la proliferación de células B, y se añaden a células T purificadas de cada grupo de ratones.

El ensayo de proliferación se lleva a cabo en placas de microvaloración de fondo redondo de 96 pocillos a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%, durante 3-5 días. Los pocillos se someten a impulsos con 1  $\mu\text{Ci}$  de <sup>3</sup>H-timidina durante 18 horas antes de la terminación de los cultivos y se recogen usando un recogedor de células Skatron. La incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en DNA como una medida de la proliferación de células T se determina usando un espectrómetro de centelleo de líquidos LKB. El grado de proliferación de células T reactivas con péptido es indicativo de las respuestas de células  $T_H$  (es decir, de la expansión clonal) que tenían lugar en los ratones después de la inmunización.

## Ejemplo 8

*Inhibición mediada por MHC conectado a péptido/Ig soluble de la inducción de EAE en ratones SJL*

La encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) es una enfermedad autoinmune en ratones y sirve como un modelo animal para la esclerosis múltiple. Se han definido regiones encefalitogénicas de dos proteínas, la proteína básica de mielina (MBP 91-103) y la proteolipoproteína (PLP 139-151). En la raza de ratón SJL susceptible, puede inducirse el desarrollo de EAE después de la inmunización con el péptido encefalitogénico o la transferencia adoptiva de células T reactivas con MBP. Para determinar si el tratamiento con complejos de fusión solubles del MHC de la invención, tales como complejo MBP 91-103/MHC I-A<sup>s</sup>/Ig y PLP 139-151/MHC I-A<sup>s</sup>/Ig evita el desarrollo de EAE después de la activación de células T, los ratones SJL pueden inyectarse con el complejo de fusión del MHC examinado, por ejemplo blastos de células T reactivas con MBP 91-103 y PLP 139-151 *in vivo*.

Para inducir la EAE en ratones SJL con MBP 91-103, los ratones son inmunizados con 400 µg de MBP 91-103 en adyuvante completo de Freund en el dorso. De 10 a 14 días más tarde, se recogen células de los nódulos linfáticos de drenaje regional, según se describe anteriormente, y se cultivan en placas de 24 pocillos a una concentración de 6 x 10<sup>6</sup> células por pocillo en 1,5 ml de medio RPMI 1640/suero bovino fetal al 10%/penicilina al 1%/estreptomicina, con la adición de MBP en 50 µg/ml. Después de una estimulación *in vitro* de 4 días, se recogen blastos de células T reactivas con MBP 91-103 a través de un gradiente de densidad de Ficoll/Hypaque, se lavan dos veces en PBS y se inyectan 1,3 x 10<sup>7</sup> células en cada ratón. Los ratones que reciben células T reactivas con MBP 91-103 encefalitogénicas reciben a continuación 100 µg de MBP 91-103/I-A<sup>s</sup>/Ig, soluble, 100 µg de MBP 1-14/I-A<sup>s</sup>/Ig (el control negativo) o solución salina normal los días 0, 3 y 7 *i.v.* (dosis total 300 µg). Se realizan evaluaciones clínicas e histológicas para confirmar que MBP 91-103/I-A<sup>s</sup>/Ig inhibía el desarrollo de EAE en estos ratones.

Para inducir EAE en ratones SJL con péptido PLP 139-151, los ratones son inmunizados con péptido PLP 139-151 disuelto en PBS y mezclado con adyuvante completo de Freund que contiene *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra en 4 mg/ml en una relación 1:1. Los ratones son inyectados con 150 µg de mezcla de adyuvante de péptido. El mismo día y 48 horas más tarde, a todos los animales se les administran 400 ng de toxina pertussis. Se realiza a continuación la transferencia adoptiva de EAE como se describe anteriormente. Se usa a continuación PLP 139-151/I-A<sup>s</sup>/Ig en vez de MBP 91-103/I-A<sup>s</sup>/Ig para evitar el desarrollo de EAE.

## Ejemplo 9

*Respuesta de los anticuerpos en ratones vacunados con los vectores de expresión del MHC conectado a péptido de la invención*

El siguiente ensayo (ilustrado con PEE-IA<sup>d</sup>/OVA) muestra como puede inducirse una respuesta inmunitaria en un mamífero de acuerdo con la invención mediante la administración (por ejemplo, IM) con uno o más vectores de expresión del MHC conectado a un péptido de presentación, de la invención, y que la co-administración de DNA que codifica para un factor co-estimulante, tal como el vector de expresión B7-1 (o B7-2), puede emplearse para aumentar más la respuesta inmunitaria según se analiza anteriormente. Este sistema proporcionará un método único para inducir respuestas inmunitarias (incluyendo proporcionar una vacunación contra un trastorno elegido) que evita las complejidades de la captación y el procesamiento de antígenos.

Ratones BALB/c (cinco por grupo) son inyectados intramuscularmente (IM) en ambas patas traseras con 100 µg de: (1) PEE-IA<sup>d</sup>/OVA que tiene las regiones de codificación de Ova 323-339/I-A<sup>d</sup> bajo el control del promotor de CMV, (b) pCMV/B7-1 o pCMV/B7-2 que contienen las regiones de codificación del gen B7-1 o B7-2 bajo el control del promotor de CMV, (c) PEE-IA<sup>d</sup>/OVA y pCMV/B7-1 o pCMV/B7-2, (d) PEE-IA<sup>d</sup>/HEL que tiene la región de codificación HEL 74-86/I-A<sup>d</sup> bajo el control del promotor de CMV, (e) PEE-IA<sup>d</sup>/HEL y pCMV/B7-1 o pCMV/B7-2 o (f) PEE-IA<sup>d</sup> que contiene la región de codificación de I-A<sup>d</sup> bajo el control del promotor de CMV. Las inyecciones se administran a las 0, 3 y 6 semanas.

A las 0, 2, 5 y 8 semanas después de la inyección inicial, la sangre se recoge de cada ratón sangrando la cola como se describe en el Ejemplo 6. La sangre se centrifuga a aproximadamente 14.000 g durante 3-5 minutos y el suero se recoge.

Los ensayos se realizan en placas de microvaloración de 96 pocillos (Maxisorp F8; Nunc, Inc.) que se han revestido en 1-50 µg/ml con OVA-KLH y HEL-KLH usando un tampón de revestimiento de Tris-HCl, pH 8,5. Las placas se cubren con película piezosensible (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, CA) y se incuban durante la noche a 4°C. Las placas se lavan a continuación con solución de lavado (Imidazol/NaCl/Tween-20 al 0,4%) y se bloquean añadiendo 100 µl/pocillo de una solución de BSA al 3%. Después de la incubación sobre un rotador de placas a temperatura ambiente durante 30 minutos, las placas se lavan 5 veces con solución de lavado. Los sueros de ratón se diluyen 1:500 en diluyente de muestra/conjugado (gelatina al 2% + Tween-20 al 0,1% en PBS) y a continuación, por duplicado, se diluyen en serie sobre la placa. Las muestras de suero de ratón se hacen pasar sobre las placas revestidas tanto con OVA-KLH como HEL-KLH para probar la reactividad cruzada. Después de la incubación sobre un rotador de placas a temperatura ambiente durante 30 minutos, las placas se lavan 5 veces con solución de lavado y a continuación se añaden a las placas apropiadas 100 µl de los conjugados anti-(IgG de ratón) de cabra-HRP (Boehringer Mannheim, Indiana-

polis, IN, dilución 1:100 en diluyente de muestra/conjugado). Después de la incubación sobre un rotador de placas a temperatura ambiente durante 30 minutos, las placas se lavan 5 veces con solución de lavado y a continuación se incuban con 100  $\mu$ l/pocillo de sustrato de desarrollo ABTS (Kirkgaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) durante 10 minutos sobre un rotador de placas a temperatura ambiente. Las reacciones se detienen con 100  $\mu$ l/pocillo de tampón de Quench (Kirkgaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) y el valor de la absorbancia a 405 nm se lee usando un lector de ELISA de placas de microvaloración automatizado (Ceres UV900HI, Bioteck, Winooski, Vermont). La concentración puede determinarse representando la lectura de la absorbancia frente al logaritmo de las diluciones de las muestras y determinando la dilución en el punto medio (50% de la absorbancia).

#### Ejemplo 10

*Detección de células T específicas para péptido después de la inducción de la respuesta inmunitaria con vectores de expresión del MHC conectado a péptido*

Para determinar si la inyección intramuscular de DNA ha inmunizado satisfactoriamente a los ratones para montar una respuesta de células colaboradoras T a ovalbúmina, puede emplearse un ensayo de proliferación de células T específico para ovalbúmina. Los ratones se inmunizan mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 9 y se preparan células T a partir de los nódulos linfáticos inguinales y paraaórticos 7 días después de la segunda inmunización.

La suspensión se agota de células que presentan antígeno mediante incubación sobre lana de nailon y columnas Spheadex G-10, y las poblaciones de células T purificadas resultantes se incuban con APCs sometidas a impulsos con el péptido Ova 323-339 o el péptido HEL 74-86. Células B activadas de ratones BALB/c se usan como células que presentan antígeno en el ensayo de proliferación. Las células B se preparan cultivando células de bazo con 50  $\mu$ g/ml de LPS durante de 48 a 72 horas, tiempo en el que las células activadas se aíslan mediante centrifugación con gradiente de densidad sobre Lymphoprep. Las células B activadas se someten a impulsos a continuación con el péptido Ova 323-339 o el péptido HEL 74-86 durante 3 horas, se lavan intensivamente, se fijan con paraformaldehído para inhibir la proliferación de células B y se añaden a células T purificadas.

El ensayo de proliferación se lleva a cabo en placas de microvaloración de fondo redondo de 96 pocillos a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%, durante 3-5 días. Los pocillos se someten a impulsos con 1  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-timidina durante 18 horas antes de la terminación de los cultivos y se recogen usando un recogedor de células Skatron. La incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en DNA como una medida de la proliferación de células T se determina usando un espectrómetro de centelleo de líquidos LKB. El grado de proliferación de células T reactivas con péptido es indicativo de las respuestas de células T<sub>H</sub> (es decir, de la expansión clonal) que tienen lugar en los ratones después de la inmunización.

#### Ejemplo 11

*Supresión de enfermedad autoinmune en ratones inyectados con vectores de expresión del MHC conectado a péptidos antagonistas de TcR*

Los Ejemplos 3 y 9-10 anteriores muestran metodologías que han de usarse para estimular respuestas inmunitarias a través de complejos de fusión del MHC de la invención. Según se analiza anteriormente, pueden emplearse procedimientos similares para inhibir respuestas inmunitarias usando péptidos antagonistas de TcR conectados a las moléculas del MHC, es decir, el péptido de presentación conectado covalentemente al péptido del MCH es un antagonista o un agonista parcial de TcR. Según se describe en el Ejemplo 1, el péptido PLP 139-151 es capaz de inducir EAE en ratones SJL. Se han caracterizado análogos de este péptido con respecto a la actividad antagonista de TcR frente a un grupo de clones de células T específicos para PLP 139-151, restringidos con I-A<sup>s</sup>. Se encontró que dos análogos diferentes, PLP W144Y (HSLGKYLGHDPDKF) (ID SEC N°: 22) y PLP-W144L (HSLGKLLGHDPDKF) (ID SEC N°: 23) eran particularmente útiles para inhibir la proliferación de células T *in vitro* en la mayoría de los clones de células T probados [Franco, A. y otros (1994) Eur J. Immunol. 24: 940-946]. Como un sistema modélico, pueden construirse vectores capaces de co-expresar las moléculas de la cadena  $\beta$  de I-A<sup>s</sup> conectada a análogos del péptido PLP y de la cadena  $\alpha$  de I-A<sup>s</sup> de longitud completa. La construcción del vector es adecuadamente similar a la esbozada en el Ejemplo 3 anteriormente. La construcción del MHC conectado a PLP 139-151 natural sirve como un control positivo (antigénico). Estos DNAs de vector (con y sin los vectores de expresión B7 o B7-2) se inyectan adecuadamente IM en ratones SJL (véase el Ejemplo 9 para los procedimientos de inyección) antes de y durante la inducción de EAE. Puede inducirse la EAE mediante la transferencia adoptiva de células T<sub>H</sub> reactivas para PLP 139-151 mediante los procedimientos que se describen en el Ejemplo 8 anterior. Se realizan evaluaciones clínicas e histológicas para confirmar que la inyección del vector de expresión de antagonista de PLP/I-A<sup>s</sup> inhibía el desarrollo de EAE en los ratones.

#### Ejemplo 12

*Construcción de vectores de expresión de MHC de I-A<sup>d</sup> conectado a péptido, de longitud completa*

Se construyeron vectores capaces de co-expresar las moléculas de la cadena  $\alpha$  de I-A<sup>d</sup> de longitud completa y la cadena  $\beta$  de I-A<sup>d</sup> conectada a péptido, como se esboza en la figura 19 de los dibujos y mediante procedimientos

iguales o similares a los descritos en el Ejemplo 3 anteriormente. Para los genes de I-A<sup>d</sup>, se aisló RNA total de la línea de células A20 del linfoma de células B de ratón. Brevemente, se homogeneizaron  $1 \times 10^8$  células A20 (Número de Registro de American Type Culture Collection TIB 208) en 6 ml de tiocianato de guanidinio 4 M enfriado con hielo, Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, usando un homogeneizador Tissue Tearer durante 5 minutos. Después de la homogeneización, se añadió sarcosilo sódico hasta una concentración final de 0,5% y la solución se mezcló a fondo. El homogenizado se centrifugó a 5000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se llevó hasta 10 ml con tiocianato de guanidinio 4 M, Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, tampón de sarcosilo sódico al 0,5%. El sobrenadante se dispuso en forma de capa suavemente sobre un colchón de 3,5 ml de CsCl 5,7 M, EDTA 0,01 M, pH 7,5, en un tubo de ultracentrífuga transparente SW41. Las muestras se centrifugaron en un rotor SW41 a 32.000 rpm durante 24 horas a 20°C. Después de la centrifugación, el sobrenadante se retiró cuidadosamente y el pellet de RNA se lavó con etanol al 70%. El RNA se disolvió en 350  $\mu$ l de acetato sódico 3 M y 970  $\mu$ l de etanol. Este procedimiento daba aproximadamente 370  $\mu$ g de RNA total. El RNA se suspendió hasta 5  $\mu$ g/ $\mu$ l con agua tratada con DEPC y se usó para la clonación por RT-PCR de los genes I-A<sup>d</sup>.

Para aislar la cadena  $\alpha$  de I-A<sup>d</sup> de longitud completa, RNA total de A20 (5  $\mu$ g) se convirtió en cDNA usando M-MLV Reverse Transcriptase (GIBCO-BRL) y cebado específico para TM de la cadena  $\alpha$  (oligonucleótido OPR139) de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante. Este cDNA se usó como el molde para la amplificación por PCR usando un cebador específico para el líder de la cadena  $\alpha$  (OPR13). Véase la figura 20 de los dibujos donde se describen las secuencias de esos cebadores OPR136 y OPR139. Las reacciones de amplificaciones por PCR típicas (100  $\mu$ l) contenían DNA de molde, 10 pmoles de los cebadores apropiados, 2,5 unidades de polimerasa de *Taq*, dNTP 100  $\mu$ M, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, gelatina al 0,01%. El molde se desnaturalizó mediante una incubación inicial a 96°C durante 5 minutos, durante los cuales la polimerasa de *Taq* se añadió para empezar en caliente la reacción. Los productos deseados se amplificaron mediante 10 ciclos térmicos de 58°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto, a continuación 96°C durante 1 minuto seguidos por 20 ciclos por etapas de 70°C durante 1,5 minutos y a continuación 96°C durante 1 minuto. El producto de PCR resultante (~ 800 pb) contiene un sitio *Xma*I 5' y un sitio *Eco*RI 3' para la clonación. Además, este fragmento tiene una secuencia de consenso de Kozak para la iniciación eficaz de la traducción (véase la figura 18A de los dibujos donde se describe la secuencia del producto de PCR). El producto de PCR se digirió con *Xma*I y *Eco*RI, se purificó en gel y se ligó a pUC18 digerido con *Xma*I/*Eco*RI, para dar el vector pJRS163-10. Después de la verificación de la secuencia, el fragmento *Xma*I/*Eco*RI se cortó, se purificó y se subclonó entre el promotor de CMV y sitios poli-A de SV40 del vector de expresión de mamífero PEE13 (Celltech), dando como resultado el vector pJRS164.

El fragmento de la cadena  $\beta$  conectado a péptido, de longitud completa, se construyó insertando las secuencias líder y TM en el vector  $\beta$ 1- $\beta$ 2 conectado al péptido Ova 323-339 (SISQAVHAAHAEINEAGR) (ID SEC N°: 24) (pB16) según se describe en el Ejemplo 1 anteriormente. RNA total de A20 (5  $\mu$ g) se convirtió en cDNA usando Superscript-MLV Reverse Transcriptase (GIBCO-BRL) y cebado específico para oligo dT o TM de la cadena  $\beta$  (con OPR135, la secuencia del mismo se muestra en la figura 20) de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante. Estos cDNAs se usaron como el molde para amplificaciones por PCR usando un par de cebadores específicos para el líder de la cadena  $\beta$  (OPR132/OPR133; las secuencias de esos cebadores se describen en la figura 20 de los dibujos) y un par de cebadores específicos para TM de la cadena  $\beta$  (OPR134/OPR135; las secuencias de esos cebadores se describen en la figura 20 de los dibujos). Las condiciones de amplificación por PCR eran similares a las descritas anteriormente en este ejemplo. Específicamente, las condiciones de ciclación térmica para amplificar la secuencia líder eran 10 ciclos térmicos de 60°C durante 1 minuto, 70°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto seguidos por 30 ciclos por etapas de 70°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto, mientras que las condiciones para amplificar el dominio TM eran 5 ciclos térmicos de 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos y 96°C durante 1 minuto seguidos por 25 ciclos por etapas de 70°C durante 1 minuto y 96°C durante 1 minuto. El producto de PCR del líder de  $\beta$  de 110 pb contiene sitios *Hind*III y *Xma*I 5' y un sitio *Afl*III 3' para clonar en el vector péptido Ova-conector- $\beta$ 1- $\beta$ 2, pB16. La inclusión del sitio *Afl*III cambia los dos últimos aminoácidos del líder de la cadena  $\beta$  de I-A<sup>d</sup> por los encontrados en el líder de IgG (véase la figura 18B de los dibujos). El producto de PCR del líder de  $\beta$  se digirió con *Hind*III y *Xma*I, se purificó en gel y se ligó en pB16 digerido con *Hind*III/*Afl*III, para dar pDM21. El producto de PCR de TM de  $\beta$  de 180 pb contiene un sitio *Bst*XI 5' y sitios *Xma*III y *Eco*RI 3' para la clonación en el vector pDM21. El producto de PCR de TM de  $\beta$  se digirió con *Bst*XI y *Eco*RI, se purificó en gel y se ligó en pDM21 digerido con *Bst*XI/*Eco*RI, para dar el vector pVW229. Este vector se digirió con *Xma*I y *Eco*RI para generar los fragmentos génicos de la cadena  $\beta$  conectados a péptido, de longitud completa, para clonar entre el promotor de CMV y sitios poli-A de SV40 del vector de expresión de mamífero PEE6 (Celltech). Estos fragmentos también tienen la secuencia de consenso Kozak (CCACCATG) (ID SEC N°: 2) para la iniciación eficaz de la traducción (véase la figura 18A de los dibujos). El pVW231 resultante se digirió con *Bgl*II y *Bam*HI. El promotor de CMV/péptido-fragmentos de cadena  $\beta$  se purificó en gel y se ligó en pJRS164 digerido con *Bam*HI, para generar el vector de expresión pJRS165.1 final que contiene genes de la cadena  $\alpha$  de I-A<sup>d</sup> de longitud completa y de la cadena  $\beta$  conectada a OVA.

Se construyeron plásmidos adicionales que contenían el gen de la cadena  $\alpha$  de I-A<sup>d</sup> de longitud completa y el gen de la cadena  $\beta$  sin un péptido conectado o con el péptido HEL 74-86 (NLCNIPSCALLSS) (ID SEC N°: 25), según se muestra en el esquema de la figura 19 de los dibujos, y servían como controles en los estudios de inducción. Los fragmentos *Afl*III/*Bst*XI de pBC1 y pB4 (según se describen en el Ejemplo 1 anteriormente) que contienen la región conector- $\beta$ 1- $\beta$ 2 y la región péptido HEL-conector- $\beta$ 1- $\beta$ 2, respectivamente, se cortaron, se purificaron en gel y se ligaron en pVW229 digerido con *Afl*III/*Bst*XI. Los vectores resultantes, pFB12 y pFBH3, tienen fragmentos *Xma*I/*Eco*RI que contienen el gen de la cadena  $\beta$  de longitud completa no conectado a péptido o conectado al péptido HEL, respectivamente. Estos fragmentos se cortaron, se purificaron en gel y se ligaron entre el promotor de CMV y los sitios poli-

A de SV40 de PEE6 digerido con *XmaI/EcoRI*, dando como resultado pB1 y pBH4. Estos vectores se digirieron con *BglIII* y *BamHI* y los fragmentos de promotor de CMV/cadena  $\beta$  se purificaron en gel y se ligaron en pJRS164 digerido con *BamHI*, para generar pAB5, el vector de expresión que contiene los genes de la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  de I-A<sup>d</sup> de longitud completa sin un péptido conectado, y pABH1, el vector de expresión que contiene los genes de la cadena  $\alpha$  de I-A<sup>d</sup> de longitud completa y la cadena  $\beta$  conectada a HEL. Muestras de los plásmidos mencionados anteriormente pJRS165.1, pAB5 y pABH1 (N° de Registro 97301, 97032 y 97033, respectivamente) se han depositado en the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland.

El gen B7-1 de múrido se amplificó a partir de una plantilla del plásmido MB7-PCR2 que tiene el gen B7 (proporcionado por E. Podack, Univ. of Miami). Estas reacciones se llevaron a cabo con polimerasa Ultima (Perkin-Elmer) de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante usando los cebadores específicos para B7, B7-1-2F y B7-1-2B (las secuencias de esos cebadores se describen en la figura 20 de los dibujos). Las condiciones de ciclación térmica eran 20 ciclos térmicos de 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 1,5 minutos y 96°C durante 1 minuto seguido por 10 ciclos por etapas de 72°C durante 1,5 minutos y 96°C durante 1 minuto. El producto de PCR generado tiene sitios *NotI* 5' y 3' para la clonación. Este fragmento también tiene la secuencia de consenso Kozak (CCACCATG) (ID SEC N°: 2) para la iniciación eficaz de la traducción. El producto se digirió con *NotI*, se purificó en gel y se ligó entre el promotor de CMV y sitios poli-A de SV40 de vector de expresión de mamífero pCMV $\beta$  digerido con *NotI* (Clontech). El vector resultante se denominó pUB719.

### Ejemplo 13

#### *Desarrollo de una línea celular que expresa un complejo de fusión funcional de la invención sobre la superficie celular*

Según se detalla adicionalmente más adelante, un tumor de células B de múrido (NSO; fondo de H-2<sup>d</sup>) se ha transfectado con la construcción pJRS165.1 (I-A<sup>d</sup> de múrido/OVA 323-339 descrito en el Ejemplo 12 anteriormente) y se ha observado mediante análisis citométrico de flujo de la superficie celular que expresa la porción del MHC del complejo de fusión. Además, se observó que el complejo de fusión expresado sobre estas células era capaz de modular la actividad del receptor de células T (TcR) apropiado induciendo la producción de IL-2 en el hibridoma de células T específico para el péptido OVA 323-339, restringido por I-A<sup>d</sup>, DO11.10. Los resultados demuestran, entre otras cosas, que (1) el péptido de fusión conectado covalentemente puede cargarse en la hendidura de unión del MHC con conservación de la conformación del MHC, (2) la fusión péptido/MHC conserva la integridad funcional de la molécula del MHC (es decir, es capaz de unirse al TcR y las células T específicas para el péptido activadas) y (3) los mecanismos fisiológicos ordinarios para la carga de péptido de las moléculas del MHC y la presentación posterior del antígeno pueden evitarse a través de la presente invención.

#### *A. Generación de linfocitos transfectados*

La línea tumoral de células T de múrido NSO se transfectó de acuerdo con the Celltech Glutamine Synthetase Gene Amplification System Manual con pequeñas modificaciones. Este método usa electroporación para transfectar células de mamífero con un vector (PEE-13) que contiene la región de codificación para la glutamina sintetasa. Las células transfectadas tienen la capacidad de sintetizar glutamina, sobreviviendo de ese modo sin un suministro exógeno. La selección de clones transformados se efectuó aislando las células que crecen en medio libre de glutamina. Brevemente, se lavaron  $1 \times 10^7$  células NSO dos veces en PBS enfriado con hielo y se resuspendieron en 760  $\mu$ l de PBS frío. Se anadieron a las células 40  $\mu$ g (40  $\mu$ l en 1  $\mu$ g/ $\mu$ l) de DNA de plásmido pJRS165.1 digerido con *SaI* (véase el Ejemplo 12 anteriormente) en una cubeta de electroporación (0,4 cm). La mezcla de células/DNA se puso sobre hielo durante 5 minutos y las células se sometieron a electroporación a continuación usando un Gene Pulser (Biorad) para aportar un impulso de 250 voltios, 960  $\mu$ Fd. Las células sometidas a impulsos se pusieron sobre hielo durante 2-5 minutos, se retiraron de la cubeta, y se anadieron 30  $\mu$ l de medio no selectivo (IMDM, FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina/estreptomicina). Las células se cultivaron en placas de microvaloración de fondo plano de 96 pocillos en 50  $\mu$ l/pocillo (4 placas, suspensión de células en 30 ml de medio como anteriormente; 5 placas, suspensión de células diluida 1:4; 5 placas, suspensión de células diluida 1:20) y a continuación se incubaron con CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Para el control negativo, se siguió el mismo procedimiento de electroporación y cultivo en placa, excepto que se omitió el DNA. Al día siguiente, se anadieron a cada pocillo 150  $\mu$ l de medio selectivo [IMDM, FBS dializado al 10%, penicilina/estreptomicina, nucleósidos (6  $\mu$ g/ml de A, G, C y U; 2  $\mu$ g/ml de T), 60  $\mu$ g/ml de glutamato y asparagina]. Las placas se alimentaron con medio selectivo en una base semanal retirando 100  $\mu$ l/pocillo de medio usado y anadiendo 100  $\mu$ l/pocillo de medio reciente, dejando que las células agotaran gradualmente el medio de toda la glutamina residual. Sólo las células que se han transformado sobrevivirán, haciéndose evidentes colonias en 14-21 días. Las colonias, o los clones, se expandieron y se rastrearon con respecto a la expresión del complejo de fusión del MHC Clase II superficial conformacionalmente correcto de la invención, según se detalla posteriormente.

#### *B. Conformación de la construcción de fusión MHC/péptido*

Los clones generados en la transfección anterior se analizaron con respecto a la expresión de complejo de fusión del MHC de Clase II a niveles significativamente superiores que la célula parental, NSO. Los clones de NSO/IA<sup>d</sup>/OVA ( $1 \times 10^5$ ) o las células de control, NSO o A20.1-11 [Kim, K. y otros (1979) J. Immunol. 122:549], se incubaron con

anticuerpo anti-IA<sup>d</sup> conjugado con FITC (Pharmlingen, dilución 1:100) en tampón de tinción (PBS/FBS al 1%) durante 45 minutos a 4°C en la oscuridad. Después de lavar tres veces en tampón de tinción, se examinó la fluorescencia en un citómetro de flujo Beckton Dickinson FACScan. Se usó un anticuerpo irrelevante de igual isotipo (anti-IA<sup>k</sup> conjugado con FITC, Pharmlingen 1:100) como control negativo. La intensidad de fluorescencia de IA<sup>d</sup> se comparó con la expresión de IA<sup>k</sup> para determinar la fluorescencia específica (véanse los resultados indicados en la Tabla 1 posteriormente). En esta tabla, los datos se presentan como fluorescencia verde máxima del canal que es una medida de la intensidad de fluorescencia y por lo tanto la densidad de las moléculas de IA<sup>d</sup> expresadas sobre la superficie celular. La línea celular de control negativo (NSO) alcanza el máximo en el canal 67 y el control positivo (A20.1-11) en el canal 1322. Los clones que exhiben fluorescencia máxima mayor del canal 100 se eligieron para el análisis adicional de la funcionalidad de la proteína de fusión. Los clones listados en la Tabla 1 se han hecho crecer en masa, se han congelado y depositado en un banco para el uso futuro. Puesto que el anticuerpo reconoce la molécula del MHC conformacional, esta capacidad para detectar el complejo de fusión del MHC sobre la superficie celular usando anticuerpo demuestra que la conformación del MHC clase II se ha conservado en el complejo de fusión recombinante.

TABLA 1

| <i>Expresión de IA<sup>d</sup> sobre clones NSO/IA<sup>d</sup>/OVA (en fluorescencia máxima del canal)</i> |                 |                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|
| CLON                                                                                                       | IA <sup>d</sup> | IA <sup>k</sup> |
| A20.1 (control +)                                                                                          | 1322            | 5               |
| NSO (control -)                                                                                            | 67              | 5               |
| NSO/IA <sup>d</sup> /OVA.B2                                                                                | 528             | 14              |
| NSO/IA <sup>d</sup> /OVA.B5                                                                                | 209             | 10              |
| NSO/IA <sup>d</sup> /OVA.B4                                                                                | 271             | 11              |
| NSO/IA <sup>d</sup> /OVA.A4                                                                                | 153             | 34              |

### C. Demostración de la actividad funcional del complejo de fusión del MHC

Para verificar la actividad biológicamente relevante de estas moléculas de proteína recombinante, se evaluó la capacidad de las moléculas para interactuar con el receptor de células T apropiado *in vitro* de una manera específica para el antígeno y provocar la activación de la célula T.

Se utilizó un hibridoma de células T de múrido, DO11.10 [Shimonkevitz, R. y otros (1983) J. Exp. Med. 158:303], que expresa sobre su superficie un receptor de células T específico para un fragmento peptídico de 21 aminoácidos (aa 323-339) derivado de ovalbúmina de huevo de pollo (OVA). Este péptido puede presentarse a DO11.10 sólo mediante células que presentan antígeno (APC) que expresan la molécula I-A<sup>d</sup> del MHC de Clase II de múrido. Cuando el péptido es presentado por la APC apropiada, las células DO11.10 responderán produciendo IL-2, que puede ensayarse a continuación como una medida de la activación de células T. La línea celular que servía como un control positivo era A20.1-11, que expresa I-A<sup>d</sup> sobre su superficie. Brevemente, las células A20.1-11 (1x10<sup>5</sup>/pocillo) se incubaron junto con péptido (1 µg/pocillo) y células DO11.10 (2x10<sup>5</sup>/pocillo), durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Las células NSO (como control negativo) y los clones NSO/I-A<sup>d</sup>/OVA (1x10<sup>5</sup>) se incubaron con células DO11.10 en ausencia de péptido. Los cultivos se llevaron a cabo en medio de cultivo completo (RPMI 1640, FBS al 10%, penicilina/estreptomycin, L-glutamina 2 mM y 2-mercaptoetanol 5x10<sup>-5</sup> M) en placas de microvaloración de fondo plano de 96 pocillos. Después de 24 horas, los sobrenadantes de cultivo se ensayaron con respecto a la presencia de IL-2 derivada de DO11.10 usando la línea de células T de múrido dependiente de IL-2, CTLL-2, según se describe posteriormente.

Brevemente, se prepararon diluciones de dos veces en serie de cada sobrenadante de cultivo en medio completo en placas de microvaloración de fondo plano y se añadieron 1x10<sup>4</sup> células CTLL-2 a cada pocillo. Después de 16-20 horas los pocillos de control negativo (CTLL-2 cultivadas con medio sólo) y los pocillos de control positivo (células CTLL-2 cultivadas con rIL-2) se examinaron microscópicamente y, en el punto en el que las células de control negativo estaban muertas en aproximadamente 90%, mientras que las células de control positivo todavía estaban proliferando activamente, se añadió MTT (2 mg/ml en PBS; 25 µl/pocillo) y las placas se devolvieron al incubador durante 4 horas adicionales. En este momento, los cristales azules de formazano formados en células que se metabolizan activamente se disolverán mediante la adición de 150 µl de HCl al 0,4 N en isopropanol por pocillo. Después de la mezcla cuidadosa, se determinó la D.O. a 562 nm usando un lector de placas (Ceres-UV900HI). Los datos que demuestran la actividad funcional de los cuatro clones analizados anteriormente junto con los controles negativos apropiados (NSO) se muestran en la figura 21 de los dibujos y se representan en una gráfica que muestra el valor de D.O. de las cuatro primeras diluciones del sobrenadante de cultivo de DO11.10, como una medida de la activación de células T.

Estos resultados establecen que el complejo de MHC/péptido expresado sobre estas células transfectadas es biológicamente funcional, ya que puede acoplar el TcR sobre DO11.10 y activar la producción de IL-2. Estos resultados indican que tales células tratadas mediante ingeniería que expresan construcciones de MHC/péptido únicas en ausencia de señales co-estimulantes pueden ser de importancia clínica en estados de enfermedad en los que una respuesta inmunitaria inapropiada a un péptido tiene consecuencias patológicas para el huésped, tal como en una alergia o en ciertos trastornos autoinmunes. Esta técnica también tiene el potencial, a través de la manipulación adicional de la célula tratada por ingeniería, de servir como un vector para aportar una señal positiva para la inmunización.

#### 10 Ejemplo 14

*Ensayo para la inducción o supresión inmunitaria por células que expresan complejo de fusión del MHC de la invención*

15 El siguiente ensayo puede emplearse para evaluar la capacidad de líneas celulares del complejo de fusión del MHC de la invención (es decir, células que tienen introducido en las mismas DNA que codifica para un complejo de fusión del MHC de la invención) para inducir o suprimir una respuesta inmunitaria en un huésped al que se han administrado las células.

20 La siguiente ejemplificación del ensayo utiliza un modelo animal de inmunización con péptido de ovalbúmina 323-331 y manipulación de la respuesta al péptido usando el complejo de fusión tratado por ingeniería que expresa células descritas en el Ejemplo 13 anterior. La metodología de este ejemplo puede aplicarse a una amplia variedad de complejos de fusión del MHC de la invención que contienen un péptido de presentación que puede modular (es decir, suprimir o inducir) una respuesta inmunitaria en mamíferos y que puede conectarse a una molécula del MHC de la invención tal como mediante un conector sensible según se describe anteriormente.

Las células que pueden utilizarse en este ensayo (NSO/IA<sup>d</sup>/OVA.B2, NSO/IA<sup>d</sup>/OVA.B4, NSO/IA<sup>d</sup>/OVA.B5 y NSO/IA<sup>d</sup>/OVA.A4) se transfectan con el DNA del complejo de fusión MHC/OVA 323-339, pJRS165.1 (véanse los Ejemplos 12 y 13 anteriores). Estas células expresan solo bajos niveles de moléculas co-estimulantes (es decir, una cantidad de proliferación de células T no eficaz) y por lo tanto no son capaces de iniciar el caso de cebado inicial para la inducción de inmunidad para el péptido (como se sabe en la técnica, las células B son capaces de activar células T de memoria, pero, a diferencia de las "APC profesionales", son incapaces de aportar la señal requerida para la inducción de inmunidad. La inyección de estas células en un huésped histocompatible puede dar como resultado interacción con células T en ausencia de moléculas co-estimulantes, y por lo tanto una inducción de insensibilidad específica para el antígeno o tolerancia a células T.

El ensayo puede efectuarse específicamente como sigue. Ratones BALB/c (IA<sup>d</sup>) (3-4 por grupo) son inyectados i.v. en la cola o s.c. en la base de la cola con las células o los reactivos listados en la Tabla 2 posterior. Las células se lavan en PBS, se resuspenden hasta  $1 \times 10^8$ /ml en PBS y se inyectan en la vena de la cola (0,1 ml;  $1 \times 10^7$  células/ratón). Se mezcla péptido de ovalbúmina (2 mg/ml en PBS) con adyuvante completo de Freund que contiene *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra en una relación de 1:1 v/v. Se inyectan 50 microlitros s.c. en cada lado de la base de la cola. Siete días después de la última inyección, los nódulos linfáticos (inguinales, paraaórticos, cervicales, braquiales) se extirpan y se homogeneizan para obtener una suspensión de células simples. Los nódulos linfáticos de ratones individuales dentro de un grupo se procesan separadamente. Las células T se purifican de las poblaciones de nódulos linfáticos mediante el paso de suspensiones de células sobre G-10 y lana de nailon para retirar células accesorias. Las células que presentan antígeno se preparan a partir de los bazo de ratones BABL/c simples homogeneizando los bazo para obtener una suspensión de células simples, lisis de eritrocitos usando solución de Gey, tratamiento con mitomicina C (100 µg/ml en RPMI 1640/FBS al 1% durante 1 hora a 37°C) para inhibir la proliferación de APC, y tres lavados para retirar la mitomicina C residual. Los ensayos para la inducción de una respuesta de células T se llevan a cabo en placas de microvaloración de fondo redondo de 96 pocillos. Se mezclan de 2 a  $4 \times 10^5$  células T con  $2-4 \times 10^5$  APC. Cada combinación de células T/APC se incuba, por triplicado, con y sin péptido de OVA (intervalo 10-200 ng/pocillo) durante 3-5 días. Aproximadamente 18 horas antes de la terminación del cultivo, se añaden 0,4 µCi de <sup>3</sup>H-timidina a cada pocillo. Los pocillos se recogen usando un recogedor de células Skatron y la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina (una medida de la síntesis de DNA y, por lo tanto de la proliferación de células T) se determina usando un espectrómetro de centelleo de líquido LKB.

Es evidente una respuesta positiva si los pocillos que contienen péptido incorporan significativamente más DNA que aquéllos sin péptido. Típicamente, los ratones se consideran positivos cuando la proliferación (en cpm media) en respuesta al péptido es mayor que aproximadamente 3 desviaciones estándar superior que la proliferación de fondo sin péptido. Para cada grupo, se calcula la proliferación específica media de péptido promediando los valores para cada uno de los tres ratones. Se considerará típicamente que la supresión de la inmunización ha ocurrido cuando la media del grupo experimental es mayor que aproximadamente 3 desviaciones estándar menor que la media del grupo de control positivo.

65 En referencia a la Tabla 2 posterior, los grupos 1 (no inyectado) y 4 (inyección de NSO sola) sirven como controles negativos y no deben responder a una estimulación *in vitro* con péptido. El grupo 2 recibe 2 inyecciones de péptido, el procedimiento de inmunización clásico, y debe responder óptimamente a la presentación de péptido *in vitro*. El grupo 3 recibe una inyección de péptido y puede esperarse que responda subóptimamente *in vitro*. El grupo 5 recibe células

NSO en primer lugar y a continuación péptido una semana más tarde. La inyección de NSO no debe interferir con el cebado por el péptido, por lo tanto los resultados de este grupo deben ser similares al grupo 3 y servir como un control negativo para la inducción de la tolerancia (grupo 7). El grupo 6 recibe las células que expresan el complejo de fusión. Debido a la falta de expresión de moléculas co-estimulantes necesarias para la estimulación de células T normales, este grupo sirve como un control negativo para el grupo 7. La ausencia de respuesta de este grupo podría significar potencialmente “falta de respuesta” o “sin respuesta específica”. El grupo 7, que recibe una inyección inicial de células NSO/IA<sup>d</sup>/OVA y a continuación una inyección de péptido, diferenciará entre estos dos resultados. Una ausencia de respuesta a la estimulación *in vitro* con péptido de este grupo demostrará la inducción de falta de respuesta específica, o la tolerancia.

TABLA 2

| Grupo Número           | Inyección N° 1           | Inyección N° 2 | Estimulación <i>in vitro</i> |
|------------------------|--------------------------|----------------|------------------------------|
|                        | (Día - 14)               | (Día - 7)      | (Día - 0)                    |
| 1                      | ----                     | ----           | ----                         |
| (control-a negativo)   |                          |                | péptido                      |
| 2                      | péptido (s.c.)           | péptido (s.c.) | ----                         |
| (control-a positivo)   |                          |                | péptido                      |
| 3                      | ----                     | péptido (s.c.) | ----                         |
| (control-a positivo)   |                          |                | péptido                      |
| 4                      | NSO (i.v.)               | ----           | ----                         |
| (control-b negativo)   |                          |                | péptido                      |
| 5                      | NSO (i.v.)               | péptido (s.c.) | ----                         |
| (control-c positivo)   |                          |                | péptido                      |
| (control-c positivo)   |                          |                |                              |
| 6                      | NSO/IA <sup>d</sup> /OVA | ----           | ----                         |
| (experimental)         | (i.v.)                   |                | péptido                      |
| (y control-d negativo) |                          |                |                              |
| 7                      | NSO/IA <sup>d</sup> /OVA | péptido (s.c.) | ----                         |
| (experimental)         | (i.v.)                   |                | péptido                      |

## Ejemplo 15

*Activación de células T después de la inyección intramuscular (i.m.) de DNA que codifica para el complejo de fusión del MHC de la invención solo o en combinación con DNA que codifica para moléculas co-estimulantes*

El músculo esquelético puede jugar un papel como un microambiente inmunológico. Un trabajo previo ha mostrado que pueden expresarse genes extraños en células musculares (Wolff, J.A. y otros, *Science* (1990) 247: 1465) y que se produce una respuesta inmunitaria contra estos antígenos (Ulmer, J.B. y otros, *Science* (1993) 259: 1745). También se ha presentado que la estimulación de células musculares humanas cultivadas (mioblastos) con interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) conduce a la expresión de complejos del MHC clase II sobre estas células (Goebels N. y otros *J. Immunol.* (1992) 149: 661-667).

Células musculares de ratón fueron inyectadas con DNA que codifica para un complejo de fusión de OVA 323-339/IA<sup>d</sup>MHCII de múrido específico (pJRS165.1) y la señal co-estimulante B7-1 (pUB719) para generar células que presentan antígeno (APCs) locales que expresan el complejo de fusión que contiene el péptido de ovalbúmina 323-339. Estas APCs activarán finalmente células T. Según se detalla posteriormente, se inyectó (i.m.) DNA que codifica para un complejo de fusión del MHC de la invención y molécula co-estimulante en ratones BALB/c para producir una respuesta de proliferación de células T específica al péptido codificado por el DNA (ilustrado con pJRS165.1 y pUB719).

Tres grupos de ratones BALB/c (3 ratones por grupo) fueron inyectados i.m. en ambos cuádriceps de las patas traseras con 50  $\mu$ l de PBS estéril que contiene los plásmidos 1) pJRD165.1 que tiene la región de codificación del OVA 323-339/IA<sup>d</sup>MHCII de múrido bajo el control del promotor de CMV solo o 2) pJRS165.1 y pUB719 que contienen la

región de codificación del gen B7-1 de murino bajo el control del promotor de CMV o 3) pUB719 solo. Los ratones se anestesiaron previamente en una cámara saturada con Metophane® (Pitman-Moor, Mundelein, IL) de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 6 anterior.

Dentro de cada grupo, 3 ratones fueron inyectados con 100  $\mu$ g de DNA en 100  $\mu$ l de PBS en la semana 0 y una inyección de refuerzo con el mismo DNA se realizó en la semana 3. Diez días después de la última inyección, se recogieron los nódulos linfáticos inguinales y paraaórticos. Las células de los nódulos linfáticos se aislaron y se sometieron a un ensayo de proliferación de células T específicas para OVA como sigue. Las células se lavaron tres veces en medio completo (RPMI-1640, FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina, estreptomicina, y 2-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$ ) y se resuspendieron en  $5 \times 10^6$  células/ml. Se añadieron 100 microlitros de la suspensión de células a pocillos de una placa de microvaloración de fondo redondo de 96 pocillos. Se prepararon diluciones del péptido OVA (323-339) que variaban de 0,8  $\mu$ g/ml a 10  $\mu$ g/ml y se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo a las células por triplicado. La proliferación de fondo se determinó omitiendo el péptido. Las placas se incubaron con CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante 3-5 días. Los pocillos se sometieron a impulsos con 0,4  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-timidina durante 18 horas antes de la terminación de los cultivos y se recogieron usando un Skatron Cell Harvester. La incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en DNA como una medida de la proliferación de células T se determinó usando un espectrómetro de centelleo de líquidos LKB. El grado de proliferación de células T reactivas con péptido era indicativo de las respuestas de células T<sub>H</sub> (es decir de la expansión clonal) que tenían lugar en los ratones después de la inmunización.

Los resultados del ensayo de proliferación se muestran en la Figura 22 de los dibujos. Específicamente, la inyección de 100  $\mu$ g de DNA no mostraba proliferación de células T específicas para OVA significativa ni en el caso de la inyección de pJRS165.1 ni si se coinyectaba pUB719. Estos resultados indican que en este caso administrar intramuscularmente DNA que codifica para complejos de fusión de OVA 323-339/MCHII solos o en combinación con DNA de molécula coestimulante no induce una respuesta inmunitaria contra el péptido de OVA. La respuesta proliferativa limitada observada con dosis altas de DNA de pJRS165.1 inyectado (es decir, 100  $\mu$ g) puede ser el resultado de transformar células dendríticas intradérmicas (APCs intradérmicas) durante la inyección (véase el Ejemplo 16 posterior).

#### Ejemplo 16

*Activación de células T in vivo después de la inyección intradérmica (i.d.) de DNA que codifica para un complejo de fusión del MHC de la invención*

Las células dendríticas son células que presentan antígeno (APCs) intradérmicas profesionales. La transformación de estas células (ilustrada en este ejemplo) u otras células (tales como las ejemplificadas en el Ejemplo 13 anteriormente) con complejos de fusión del MHC clase II específicos, de la invención, puede inducir una respuesta de células T específicas para el péptido. Estas APCs ya tienen las moléculas co-estimulantes (es decir, B7-1) que proporcionan la segunda señal de activación a las células T.

Dos grupos de ratones BALB/c (9 ratones por grupo) fueron inyectados en el dorso afeitado con 100  $\mu$ l de PBS que contenían 10  $\mu$ g de 1) pJRS165.1 que tiene la región de codificación del gen de fusión de murino OVA 323-339/MHC clase II de IA<sup>d</sup> bajo el control del promotor de CMV o 2) pABH1 que tiene la región de codificación del complejo de fusión de murino HEL 74-86/MHCII de I-A<sup>d</sup> bajo el control del promotor de CMV como un grupo de control. Cuatro, 7 y 14 días después de la inyección se recogieron los nódulos linfáticos inguinales y paraaórticos. Las células de los nódulos linfáticos se aislaron y se sometieron a un ensayo de proliferación de células T específicas para OVA como sigue. Las células se lavaron tres veces en medio completo (RPMI-1640, FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina, estreptomicina, y 2-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M) y se resuspendieron en  $5 \times 10^6$  células/ml. Se añadieron 100 microlitros de la suspensión de células a pocillos de una placa de microvaloración de fondo redondo de 96 pocillos. Se prepararon las diluciones del péptido OVA (323-339) que variaban de 0,8  $\mu$ g/ml a 10  $\mu$ g/ml y se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo a las células por triplicado. La proliferación de fondo se determinó omitiendo el péptido. Las placas se incubaron con CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C, durante 3-5 días. Los pocillos se sometieron a impulsos con 0,4  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-timidina durante 18 horas antes de la terminación de los cultivos y se recogieron usando un Skatron Cell Harvester. La incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en DNA como una medida de la proliferación de células T se determinó usando un espectrómetro de centelleo de líquidos LKB. El grado de proliferación de células T reactivas con péptido era indicativo de las respuestas de células T<sub>H</sub> (es decir de la expansión clonal) que tenían lugar en los ratones después de la inmunización.

Los resultados de los ensayos de proliferación se muestran en la Figura 23 de los dibujos. No se detecta una proliferación de células T específica significativa (aproximadamente 2.500 cpm) 4 días después de la inyección en ratones inyectados con pJRS165.1 o pABH1. Siete días después de la inyección, las células de los nódulos linfáticos de ratones inyectados con pJRS165.1 muestran una proliferación 12 veces superior con una concentración de péptido estimulante de 0,31  $\mu$ g/ml en comparación con el día 4. Concentraciones de péptido superiores reducían la respuesta proliferativa hasta aproximadamente 15.000 cpm. Sin embargo, las células de ratones inyectados con pABH1 no mostraban un incremento significativo en la proliferación (aproximadamente 7.000 cpm) en los 3 puntos temporales. La respuesta proliferativa específica (OVA) el día 14 después de la inyección es 3 veces inferior que el día 7, indicando que ha transcurrido el período de estimulación máxima. Estos resultados indican que las APCs intradérmicas se han transformado con complejo de fusión de OVA 323-339/MHCII funcional y que las células T específicas para OVA se

han cebado y expandido. Debido a la ausencia de estímulo (péptido HEL) las células T específicas para HEL (activadas por APCs transformadas con pABH1) no proliferan en la prueba. Se observa un período de retraso de 4 días antes de cualquier activación de células T.

## Ejemplo 17

*Construcción de vectores para expresar moléculas del MHC clase II monocatenarias, solubles y unidas a la membrana, con péptidos de presentación específicos*

Los genes del MHC clase II usados para estas construcciones se aislaron originalmente mediante amplificación por PCR de cDNA generado a partir de las APC apropiadas según se describe en los ejemplos anteriores (véase en particular el Ejemplo 1 anterior). Fragmentos de los genes de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de I-A<sup>d</sup> se generaron mediante amplificación por PCR usando genes clonados como DNA de molde y se montaron en el esquema de clonación mostrado en la figura 25 de los dibujos dando como resultado un gen quimérico que codifica el péptido antigénico, OVA 323-339, conectado a una molécula de I-A<sup>d</sup> monocatenaria. Brevemente, el fragmento génico  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  clonado en 39AD2 servía como el molde para la amplificación por PCR usando los cebadores JLA007 y JLA010 (todos los oligonucleótidos usados en la clonación se listan en la figura 26 de los dibujos, dando como resultado la adición de un sitio de restricción *XhoI* 5' y uno *XmaI* 3'. El producto de PCR de  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  se digirió con *XhoI* y *XmaI*, se purificó en gel y se subclonó en el vector pLL101 dando como resultado la construcción pJA $\alpha$ 9. Este vector añade una secuencia que codifica una etiqueta 6xHis al extremo de la proteína  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  para ayudar en la purificación de la proteína.

La estrategia para aislar el fragmento génico  $\beta 1$ - $\beta 2$  de I-A<sup>d</sup> y enlazarlo a la secuencia conectora se ha descrito en los ejemplos anteriores. El conector de 10 aa-fragmento génico  $\beta 1$ - $\beta 2$  en pBC1 servía como el molde para la amplificación por PCR usando cebadores JLA005 y JLA009 para añadir sitios de restricción *NcoI* y *SpeI* necesarios para la clonación posterior. Los productos de PCR se digirieron con pJA $\alpha$ 9 digerido con *NcoI*/*SpeI* dando como resultado la construcción pJA $\alpha$ 9 $\beta$ 20. Para generar una molécula de clase II monocatenaria, se determinó mediante modelado computarizado de la estructura cristalina de HLA-DR1 que podía insertarse un conector flexible entre el extremo carboxilo del dominio  $\beta 2$  y el extremo amino del dominio  $\alpha 1$ . Basándose en que la distancia entre estos residuos era 47 angstroms, un conector de 24 aminoácidos comprendido principalmente por el motivo (GGGGS) repetido cuatro veces se modeló y se usó. Para insertar secuencias que codifican este péptido flexible entre los fragmentos génicos de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  clonados, los oligonucleótidos, JA301 y JA302, se reasociaron y se ligaron en pJA $\alpha$ 9 $\beta$ 20 digerido con *SpeI*/*XhoI*. La construcción resultante se denominó pJALNK. pJALNK se digirió con *NheI* y *EcoRI* y el fragmento génico monocatenario de  $\beta 1\beta 2$ - $\alpha 1\alpha 2$  se purificó en gel. Este fragmento se insertó en el vector pVW229 que tenía la secuencia líder de la cadena  $\beta$  y las regiones que codifican el péptido OVA 323-339 según se describe en los ejemplos anteriores. La construcción resultante SSC1 contiene un gen quimérico que codifica el líder de  $\beta$ /péptido OVA/conector de 10 aa/ $\beta 1$ - $\beta 2$ /conector de 20 aa/ $\alpha 1$ - $\alpha 2$ /etiqueta 6xHis. La secuencia de este gen se muestra en la figura 27 de los dibujos.

Para construir un vector para la expresión de moléculas solubles de clase II monocatenarias (sc) en un sistema de expresión de células de insecto, el gen quimérico se retiró de SSC1 mediante digestión con *NcoI* y *EcoRI* y se purificó en gel. El fragmento se ligó en vector p2Bac digerido con *NcoI*/*EcoRI* (número de serie In Vitrogen V1980-10) para crear pMBSC1.2.

Para genera un vector capaz de expresar moléculas de clase II sc unidas a membrana en células de mamífero, el fragmento *BclI*/*EcoRI* de pJRS163-10 que codifica el dominio de transmembrana (TM) de la cadena  $\alpha$  se subclonó en vector SSC1 digerido con *BclI*-*EcoRI*. El vector resultante, SCTM1, se digirió con *XmaI* y *EcoRI* y el casete I-A<sup>d</sup>-OVA monocatenario se insertó en el vector de expresión de mamífero PEE13, dando la construcción SCT1. La secuencia del gen quimérico se muestra en la figura 28 de los dibujos.

Para generar un vector capaz de expresar moléculas del MHC sc solubles en células de mamífero, el DNA de molde de la cadena  $\alpha$  se amplificó mediante PCR a partir de pJRS163-10 usando los cebadores JS305 y OPR142, añadiendo de ese modo una secuencia que codifica la etiqueta del anticuerpo EE en el extremo 3' del fragmento génico. El producto de PCR se digirió con *BclI* y *EcoRI* y se clonó en el vector SSC1 digerido. El vector resultante, SEE1, se digirió con *BclI*-*EcoRI* y el casete I-A<sup>d</sup>-OVA monocatenario se insertó en el vector de expresión de mamífero PE13, dando la construcción SCE1. La secuencia del gen quimérico se muestra en la figura 29 de los dibujos. Muestras de los plásmidos monocatenarios anteriores, pMBSC1.2, SCT1 y SCE1, se han depositado en the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland.

## Ejemplo 18

*Producción de moléculas del MHC monocatenarias solubles de la invención (MHC II (I-A<sup>d</sup>) en células de insecto)*

El plásmido pMBSC1.2 purificado se usó en una cotransfección y el virus recombinante se enriqueció a partir de AcMNPV de tipo salvaje limitando la dilución (véase D.R. O'Reilly y otros, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual. WH Freeman & Co. Nueva York (1992)). Se usaron células SF9 en todas partes.

## ES 2 152 424 T5

El sobrenadante de los pocillos se probó mediante ELISA para identificar virus que producen productos recombinantes (sc I-A<sup>d</sup>-OVA). El ensayo de ELISA implica revestir 100 ng de anti-IA<sup>d</sup> M5/114 (ATCC TIB 120) sobre los pocillos de placas de microvaloración de 96 pocillos en 50 microlitros de tampón de carbonato 0,1 M, pH 8,2. El bloqueo se realizó con 200  $\mu$ l de PBS, FBS al 10% (suero bovino fetal de Biowhittaker, número de serie 14-901F) durante al menos 1 hora y las placas se lavaron tres veces con 200  $\mu$ l de tampón de lavado (PBS con 0,5 ml de Tween 20/1). Las muestras se añadieron en 100  $\mu$ l/pocillo y se incubaron 15 minutos a 37°C. Las placas se lavaron 4 veces con 200  $\mu$ l de tampón de lavado. Se añadió anti-IA<sup>d</sup> AMS-32.1 biotinilado (número de serie 06032D de Pharmingen) en 100 mg/pocillo en 100  $\mu$ l de PBS-FBS al 10%. Después de la incubación durante 15 minutos a 37°C, las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado. Se añadió peroxidasa de avidina (Sigma) a 250 ng/pocillo en 100  $\mu$ l/pocillo de PBS-FBS al 10% y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Las placas se lavaron a continuación ocho veces con 200  $\mu$ l de tampón de lavado y se añadieron 100  $\mu$ l de sustrato ABTS (Kirkegaard y Perry, números de serie 5060-00 ó 50-60-01) por pocillo. La absorbancia se midió a 405 nm.

El sobrenadante de la mezcla de cotransfección se probó con respecto a la reactividad de I-A<sup>d</sup> mediante el ensayo de ELISA anterior. La absorbancia media de pocillos por duplicado se muestra en la Tabla 3 posterior. La especificidad de la señal observada se debe a la secreción de sc I-A<sup>d</sup>-OVA en el sobrenadante de cultivo por células SF9.

Se realizó subclonación por dilución limitativa sobre la mezcla de cotransfección diluyendo virus en medios completos (TNMFH, número de serie 51942 de JRH Biosciences complementado con FBS al 10%) e incubando diluciones de virus con  $2 \times 10^4$  células SF9/pocillo en placas de 96 pocillos. El sobrenadante de los pocillos que mostraba signos visibles de infección pero no poliedros se probó en el ELISA de IA<sup>d</sup>. Los clones C6 (1,557) y F8 (1,446) son fuertemente positivos. C12 es claramente negativo (0,124).

Se añadieron 500 microlitros de clon positivo C6 a cada uno de tres matraces de un litro que contenían células SF9 en  $1 \times 10^6$  células/ml. Se usaron aproximadamente 2.200 ml de sobrenadante de infección en la purificación de sc I-A<sup>d</sup>-OVA según se describe en el Ejemplo 19 posterior. El complejo de MHCII monocatenario así purificado se ensayó con respecto a la capacidad para modular la actividad de hibridoma de células T DO11.10 según se describe en el Ejemplo 20 posterior.

TABLA 3

| ELISA de I-A <sup>d</sup> de sobrenadantes de cultivos de células de insectos a partir de cotransfecciones |             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Dilución de la Muestra                                                                                     | Absorbancia |
| No diluida                                                                                                 | 0,857       |
| 1:2                                                                                                        | 0,524       |
| 1:4                                                                                                        | 0,305       |
| 1:8                                                                                                        | 0,165       |

Los controles negativos que incluyen diluyente de muestra (0,064) y sobrenadante de una infección realizada con un baculovirus recombinante que contiene el gen de Enolasa Específica de Neuronas (NSE) en células SF9 mostraban una unión insignificante (0,098).

### Ejemplo 19

*Purificación de moléculas del MHC monocatenarias de la invención (MHCII (I-A<sup>d</sup>) expresadas en células de insecto)*

Las siguientes etapas se llevaron a cabo en la preparación de I-A<sup>d</sup>-OVA monocatenario soluble a partir de sobrenadantes de cultivo de células de insecto.

Fraccionación con Sulfato Amónico: A 0-4°C, se añadió lentamente sulfato amónico sólido (0,436 g/ml) a medio de cultivo de células de insecto (2200 ml) mientras se agitaba la muestra. Después de la adición de sulfato amónico, la agitación de la muestra se continuó durante 30 minutos. La mezcla se centrifugó a continuación a 26000 g y 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó, y el pellet se resuspendió en 100 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). La muestra resuspendida se dializó contra 4000 ml de PBS a 4°C durante aproximadamente 20 horas,

con un cambio de PBS reciente después de las primeras 4,5-5 horas de diálisis. El volumen de la muestra dializada se midió y se añadió NaCl sólido y Tween 20 al 20% (v/v) a NaOH 0,5 N, seguido por filtración a través de un filtro de 0,8 micras.

- 5 Afinidad de Quelatos Metálicos y Cromatografía de Inmunofinidad: Todas las etapas siguientes se realizaron a temperatura ambiente.

Ni-IDA Sepharose: La muestra proporcionada por la etapa de fraccionación anterior se cargó en una columna Ni-IDA Sepharose Fast Flow (2,6 x 7,2 cm, 38,0 ml) que se había equilibrado con al menos 5 volúmenes de lecho de PBS, NaCl 0,5 M, Tween 20 al 0,2% (v/v), pH 8. El caudal para la muestra de carga era 3 ml/minuto. A continuación, la columna se lavó con al menos 7-8 volúmenes de lecho del tampón de equilibración anterior, seguido por 2,5-3 volúmenes de lecho de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7,0, NaCl 0,2 M. El caudal para el lavado era 5 ml/minuto. La proteína I-A<sup>d</sup> se eluyó con disminuciones de pH escalonadas efectuadas mezclando diferentes proporciones de tampón A (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7,0, NaCl 0,2 M) y Tampón B (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, pH 3,0, NaCl 0,2 M) programadas en un controlador FPLC. Un ensayo de ELISA que usaba anticuerpo monoclonal anti-I-A<sup>d</sup> (que reconoce epítopos conformacionales de moléculas de I-A<sup>d</sup>) indicaba que I-A<sup>d</sup> está presente en fracciones eluidas por Tampón B a 90% y 100%. Los picos de A<sub>280 nm</sub> eluidos por Tampón B al 90% y 100% se reunieron, ajustando inmediatamente hasta pH 7,0 con Tris 1 M. La muestra se concentró y se intercambió el tampón por Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, mediante ultrafiltración.

Cromatografía de Inmunofinidad: La muestra de la etapa anterior se hizo pasar en primer lugar a través de una columna Protein A Sepharose Fas Flow (1,6 x 5 cm, 10 ml) y a continuación se aplicó a una columna (1,6 x 3,4 cm, 6,8 ml) de Protein A Sepharose Fas Flow reticulada con MKD 6, un anticuerpo monoclonal anti-I-A<sup>d</sup>. Las dos columnas se habían equilibrado previamente con Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Después de la aplicación de la muestra, la columna de inmunofinidad se lavó con Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, hasta que se alcanzaba una línea base de A<sub>280 nm</sub>. La columna de anticuerpo se lavó a continuación con el mismo tampón que contiene NaCl 1 M que anteriormente para retirar proteínas unidas no específicas. La proteína I-A<sup>d</sup> se eluyó a continuación con glicina 50 mM-NaOH, pH 11,0. El pico de proteína eluido (verificado mediante A<sub>280nm</sub>) de la columna de anticuerpo se ajustó inmediatamente hasta pH 8,0 con glicina 2 M, pH 2,0, se concentró y se intercambió el tampón por Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, mediante ultrafiltración. La muestra purificada se almacenó a 4-8°C. La pureza y la funcionalidad de la muestra de I-A<sup>d</sup> se probaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico y un ensayo de activación de células T (véase posteriormente), respectivamente. El I-A<sup>d</sup>-OVA monocatenario purificado de esta preparación no mostraba bandas contaminantes en un gel de poliacrilamida teñido con Coomassie y la proteína total era 125 µg/ml mediante el ensayo de proteína total.

## Ejemplo 20

### *Actividad de complejos del MHC monocatenarios de la invención*

Se determinó si los complejos de I-A<sup>d</sup>/OVA-MHC monocatenarios purificados de la invención podían activar el hibridoma de células T DO11.10 específico para OVA según se medía mediante producción de IL-2 e IL-4. Este método implica revestir I-A<sup>d</sup>/OVA monocatenario en placas IMMULON II (Dynatech) en PBS durante la noche a 4°C. Los pocillos se vaciaron, se lavaron una vez con PBS y se añadieron 1 x 10<sup>5</sup> células DO11.10 por pocillo en 220 µl de RPMI-FBS al 10%. Después de la incubación durante la noche a 37°C en un incubador húmedo con CO<sub>2</sub> al 10%, se recogieron los sobrenadantes de cultivo, las células se retiraron mediante centrifugación y se determinaron los niveles de IL-2 e IL-4 mediante ELISA como sigue.

El anticuerpo de captura de ELISA de anti-(IL-2 de ratón) de rata (Pharmingen, número de serie 18161D) se revistió a 100 ng/pocillo en 50 µl de carbonato 0,1 M, pH 8,2. El bloqueo se realizó con 200 µl de PBS-FBS al 10% durante al menos 1 hora y las placas se lavaron 3 veces con 200 µl de tampón de lavado (PBS con 0,5 ml de Tween 20 por l). Las muestras se añadieron en 100 µl/pocillo y se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron 4 veces con 200 µl de tampón de lavado y se añadió anti-(IL-2 de ratón) de rata biotinilado (Pharmingen) a 100 ng/pocillo en 100 µl de PBS-FBS al 10%. Después de la incubación durante 45 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado. Se añadió peroxidasa de avidina (Sigma, número de serie A-3151) a 250 ng/pocillo en 100 µl/pocillo de PBS-FBS al 10% y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron a continuación ocho veces con 200 µl de tampón de lavado y se añadieron 100 µl de sustrato ABTS (Kirkegaard y Perry, número de serie 5060-00 ó 50-66-01) por pocillo. La absorbancia se midió a 405 nm. El procedimiento de ELISA de IL-4 era idéntico excepto por el uso de anticuerpos de captura y sonda específicos para IL-4 (Pharmingen). Los resultados de un ensayo de activación se muestran en la Tabla 4 posteriormente. Ni las células DI11.10 solas ni las células DO11.10 + A20 (positivas a I-A<sup>d</sup>) secretaban IL-2 o IL-4. El sc I-A<sup>d</sup>-OVA daba como resultado la secreción de IL-2 e IL-4 por el hibridoma de células T DO11.10. Una segunda activación se realizó con dosis inferiores de sc I-A<sup>d</sup>-OVA inmovilizado. Los niveles de secreción de IL-2 e IL-4 se valoraban ambos hasta cero, como se muestra en la Tabla 5 posteriormente. En ambos experimentos, eran secretadas IL-2 e IL-4 por células DO11.10 de una manera dependiente de la dosis con respecto a la exposición a sc I-A<sup>d</sup>-OVA inmovilizado.

TABLA 4

| Ensayo de activación de DO11.10 usando sc I-A <sup>d</sup> -OVA inmovilizado |                                               |                                               |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| sc I-A <sup>d</sup> -OVA<br>(ng/pocillo)                                     | concentración de IL-2<br>en DO11 super (U/ml) | concentración de IL-4<br>en DO11 super (U/ml) |
| 2500                                                                         | 143                                           | 23                                            |
| 1250                                                                         | 126                                           | 20                                            |
| 625                                                                          | 116                                           | 15                                            |
| 312                                                                          | 109                                           | 16                                            |
| 156                                                                          | 100                                           | 10                                            |
| 78                                                                           | 45                                            | 7                                             |
| 0 (DO11.10 solamente)                                                        | 0                                             | 0                                             |

TABLA 5

| Ensayo de activación de DO11.10 usando dilución extendida con sc I-A <sup>d</sup> -OVA purificado inmovilizado |                                               |                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| sc I-A <sup>d</sup> -OVA<br>(ng/pocillo)                                                                       | concentración de IL-2<br>en DO11 super (U/ml) | concentración de IL-4<br>en DO11 super (U/ml) |
| 625                                                                                                            | 38                                            | 2,0                                           |
| 312                                                                                                            | 35                                            | 1,5                                           |
| 156                                                                                                            | 24                                            | 0,9                                           |
| 78                                                                                                             | 17                                            | 0,8                                           |
| 39                                                                                                             | 0                                             | 0                                             |
| 0 (DO11.10 solamente)                                                                                          | 0                                             | 0                                             |

## Ejemplo 21

*Producción de moléculas del MHC monocatenarias (clase II) en células de mamífero*

La transfección y la selección de líneas celulares de mamífero se llevaron a cabo como sigue:  $1 \times 10^7$  células NSO se lavaron dos veces en PBS enfriado con hielo. Se resuspendieron en 760  $\mu$ l de PBS frío y se mezclaron con 40  $\mu$ g (1  $\mu$ g/ml) de DNA de plásmido SC1 o SCT1 linealizado con *SalI*. Después de 5 minutos de incubación sobre hielo, las células se sometieron a electroporación usando un Gene Pulser (Biorad) para aportar un impulso de 250 voltios, 960  $\mu$ Fd. Las células sometidas a impulsos se pusieron sobre hielo durante 2-5 minutos y se añadieron 30 ml de medio no selectivo (IMDM, FBS al 10%, glutamina 2 mM, 5000 unidades/ml de penicilina, 500  $\mu$ g/ml de estreptomicina). Las células se cultivaron en placas de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos y, 24 horas más tarde, se añadieron a cada pocillo 150  $\mu$ l de medio selectivo (IMDM, FBS dializado al 10%, 5000 unidades/ml de penicilina, 5000  $\mu$ g/ml de estreptomicina, 1 x nucleósidos, 1 x glutamato + asparagina). Las placas se alimentaron con medio selectivo en una base semanal retirando 100  $\mu$ l/pocillo de medio usado y añadiendo 100  $\mu$ l/pocillo de medio selectivo reciente, dejando que las células agotaran gradualmente el medio de toda la glutamina residual. El gen de glutamina sintetasa contenido en los plásmidos SCE1 y SCT1 permite el crecimiento selectivo de las células transfectadas en medios libres de glutamina. Las colonias de las células transfectadas con el plásmido se hacían evidentes después de 14-21 días. Los transfectantes que tenían el vector SCT1 (es decir la forma unida a la membrana de las moléculas de sc I-A<sup>d</sup>-OVA) se expandieron y se rastrearon con relación a la expresión de las moléculas del MHC mediante citometría de flujo según se describe anteriormente.

## ES 2 152 424 T5

Los clones generados a partir del procedimiento de transfección/selección se analizaron con respecto a la expresión superficial de moléculas del MHC de clase II a niveles significativamente superiores que la línea de células parentales. Las células se incubaron con anticuerpo anti-I-A<sup>d</sup> conjugado con FITC, AMS 32.1 (PharMingen, dilución 1:100) en tampón de tinción frío (PBS, FCS al 1%) durante 45 minutos en la oscuridad. Después de lavar tres veces en tampón de tinción, se examinó la fluorescencia de un citómetro de flujo FACSsan (Beckton Dickinson). Un anticuerpo anti-I-A<sup>k</sup> conjugado a FITC de igual isotipo, 10-3.6 (PharMingen, dilución 1:100), se usó como un control negativo. Los resultados de tal ensayo, mostrados posteriormente en la Tabla 6 para tres líneas celulares transfectadas con SCT1 independientes, indican que las células transfectadas expresan el sc I-A<sup>d</sup>-OVA sobre su superficie celular.

Los transfectantes que tienen el vector SCE1 (es decir, forma soluble de las moléculas sc I-A<sup>d</sup>-OVA) se expandieron y se rastrearon con relación a la expresión y la secreción de las moléculas del MHC mediante los ensayos de ELISA específicos para I-A<sup>d</sup> descritos en el Ejemplo 18 anteriormente. Los resultados de tal ensayo del sobrenadante de cultivo de dos líneas celulares transfectadas SCE1 se muestran en la Tabla 7 posteriormente. Estos resultados indican que las células transfectadas producen y secretan la molécula de sc I-A<sup>d</sup>-OVA. Este sistema podría usarse para generar grandes cantidades de moléculas solubles del MHC monocatenarias conectada a péptido.

TABLA 6

| Expresión superficial de moléculas I-A <sup>d</sup> sobre líneas de células transfectadas |                                  |                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|                                                                                           | Fluorescencia Principal          |                                  |
| Línea celular                                                                             | Específica para I-A <sup>d</sup> | Específica para I-A <sup>k</sup> |
| NSO (parental)                                                                            | 280,4                            | 32,1                             |
| T2 (transfectante SCT1)                                                                   | 612,8                            | 22,0                             |
| T6 (transfectante SCT1)                                                                   | 417,9                            | 45,1                             |
| T12 (transfectante SCT1)                                                                  | 911,1                            | 45,9                             |

TABLA 7

| Ensayo de ELISA de I-A <sup>d</sup> sobre sobrenadantes de cultivo celular de transfectantes SCE1 |             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Sobrenadante de cultivo (no diluido)                                                              | Absorbancia |
| NSO (línea celular parental)                                                                      | 0,444       |
| E10 (transfectante SCE1)                                                                          | 0,781       |
| E11 (transfectante SCE1)                                                                          | 0,960       |
| sc I-A <sup>d</sup> -OVA de cultivo de células de insecto (control positivo)                      | 2,44        |

### Ejemplo 22

#### Actividad de las moléculas I-A<sup>d</sup> monocatenarias expresadas sobre células de mamífero

La estimulación de la liberación de IL-2 a partir del hibridoma de células T DO11.10 restringido por I-A<sup>d</sup> específico para OVA 323-339 se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 29 anteriormente. Brevemente, 1x10<sup>5</sup> células transfectantes SCT1 o A20.11 se incubaron junto con (cantidades variables de) péptido OVA y 2x10<sup>5</sup>/pocillo células DO11.10 a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Los cultivos se llevaron a cabo en medio completo (RPMI 1640 complementado con FBS al 10%, FBS al 10%, penicilina/estreptomicina, L-glutamina y 2-mercaptoetanol 50 μM) en placas de microvaloración de fondo plano de 96 pocillos. Después de 24 horas, los sobrenadantes de cultivo se ensayaron con respecto a la presencia de IL-2 derivada de DO11.10 usando el ensayo de ELISA de IL-2 descrito en el Ejemplo 20 anteriormente o midiendo el crecimiento de la línea de células T de murido dependiente de IL-2, CTLL-2. En la última prueba, se prepararon diluciones de dos veces en serie de cada sobrenadante de cultivo en medio completo en placas de microvaloración de fondo plano y se añadieron 1x10<sup>4</sup> células CTLL-2 a cada pocillo. Una curva estándar

## ES 2 152 424 T5

de (cantidades de) rIL-2 se trazó en paralelo. Después de 16 a 20 horas, se añadió MTT (2 mg/ml, 27  $\mu$ l/pocillo) y las placas se incubaron durante 4 horas. En este momento, los cristales azules formados por MTT en células que se metabolizan activamente se disolvieron mediante la adición de 150  $\mu$ l de HCl 0,4 N en isopropanol. Después de mezclar, la D.O. a 562 nm se determinó usando un lector de placas Ceres-UV900HI. La absorbancia corresponde al nivel de crecimiento de células CTLL apoyado por la IL-2 en los medios de cultivo.

Los resultados de dos de tales ensayos de activación se muestran en las Tablas 8 y 9 posteriores. Se obtuvieron resultados similares usando el ensayo de CTLL.

TABLA 8

| Activación de hibridoma de células T DO11.10 por líneas de células transfectadas con SCT1 |                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Célula que presenta antígeno ensayada                                                     | Resultado de ELISA de IL-2 (Absorbancia) |
| NSO (línea celular parental)                                                              | 0,047                                    |
| T2 (transfectante SCT1)                                                                   | 0,758                                    |
| T6 (transfectante SCT1)                                                                   | 0,307                                    |
| Péptido A20 + OVA 323-339 (control positivo)                                              | 1,33                                     |

TABLA 9

| Activación de hibridoma de células T DO11.10 por células T12 transfectadas con SCT1 |                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Célula que presenta antígeno ensayada                                               | Resultado de ELISA de IL-2 (Absorbancia) |
| NSO (línea celular parental)                                                        | 0,078                                    |
| T12 (transfectante SCT1)                                                            | 1,03                                     |
| Péptido A20 + OVA 323-339 (control positivo)                                        | 1,45                                     |

### Ejemplo 23

*Métodos de inmunosupresión que usan moléculas solubles del MHC clase II monocatenarias conectadas a péptido, de la invención*

Para probar si las moléculas solubles de clase II monocatenarias conectadas a péptidos pueden inducir anergia de células  $T_H$  en un sistema modélico animal, pueden examinarse los efectos de las moléculas sobre el cambio de la clase de inmunoglobulina (es decir, de IgM a IgG) dependiente de células  $T_H$  y sobre la expansión clonal de líneas de células T específicas para el péptido.

Para examinar el cambio de clase de Ig, se establecen dos grupos de prueba como sigue: (a) 10 ratones BALB/c son inyectados con 100  $\mu$ g de OVA 323-339 en adyuvante completo de Freund H37Ra en la base de la cola y reforzados de nuevo 7 días más tarde, para inducir una respuesta inmunitaria al péptido OVA 323-339. El día antes del día de cada inmunización con OVA, 5 de los ratones son inyectados IV con 10-100  $\mu$ g del I-A<sup>d</sup> OVA monocatenario soluble en PBS. Esta proteína de fusión soluble se unirá al receptor de células T (TcR) presentado sobre las células THE específicas para OVA 323-339. Debido a la ausencia de la señal co-estimulante, estas células  $T_H$  son inducidas a un estado de anergia. Puesto que el cambio de la clase de inmunoglobulina es un procedimiento dependiente de células  $T_H$ , se espera que la inducción de anticuerpo anti-IgG de OVA 323-339 se reduzca en los ratones tratados con I-A<sup>d</sup>-OVA monocatenario. Los 5 ratones restantes sirven como control y reciben PBS.

Diez días después de la segunda inmunización, se recoge sangre de cada ratón mediante sangrado de la cola. La sangre se centrifuga a aproximadamente 14.000 G durante 3-5 minutos y el suero se recoge. Los ensayos se realizan en placas de microvaloración de 96 pocillos (Maxisorp F8; Nunc, Inc.) revestidas en 1-50  $\mu\text{g/ml}$  de ovalbúmina usando un tampón de revestimiento de Tris-HCl, pH 8,5. Las placas se cubren con película piezosensible (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, CA) y se incuban durante la noche a 4°C. Las placas se lavan a continuación con solución de lavado (Imidazol/NaCl/Tween-20 al 0,4%) y se bloquean añadiendo 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de una solución de BSA al 3%. Después de la incubación sobre un rotador de placas a temperatura ambiente durante 30 minutos, las placas se lavan 5 veces con solución de lavado. Los sueros de los ratones se diluyen 1:500 en diluyente de muestra/conjugado (gelatina al 2% + Tween-20 al 0,1% en PBS) y a continuación, por duplicado, se diluyen en serie sobre la placa. Se establecen dos placas idénticas para cada proteína de revestimiento, una para la determinación de la concentración de IgM y la otra para IgG. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, las placas se lavan 5 veces con solución de lavado. Se añaden a las placas apropiadas conjugados anti-(IgM de ratón) de cabra-HRP y anti-(IgG de ratón) de cabra-HRP (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, dilución 1:100 en diluyente de muestra/conjugado). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, las placas se lavan 5 veces con solución de lavado y a continuación se incuban con 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de sustrato de desarrollo ABTS (Kirkgaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones se detienen con 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de tampón de Quench (Kirkgaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) y los valores de la absorbancia se leen a 405 nm usando un lector de ELISA de placas de microvaloración automatizado (Ceres UV900HI, Biotek, Winooski, Vermont). La concentración se determina representando la lectura de la absorbancia frente al logaritmo de las diluciones de las muestras. Las concentraciones para IgM se comparan a continuación. Según se detalla anteriormente, se espera que las moléculas solubles de MHC clase II monocatenario ligado a péptido inhiban el cambio de clase de IgG de una manera específica para el péptido debido a la anergia inducida en las células T<sub>H</sub> reactivas con péptido correspondientes.

Los efectos de las moléculas solubles de MHC monocatenario conectado a péptido sobre la expansión clonal de líneas de células T específicas para el péptido *in vivo* pueden examinarse como sigue. Los grupos de tratamiento (4 ratones por grupo) son adecuadamente los mismos que los descritos anteriormente. El procedimiento de inmunización es adecuadamente como sigue: los ratones se inyectan IV con 10-100  $\mu\text{g}$  de la proteína de fusión soluble de I-A<sup>d</sup>-OVA monocatenaria en PBS y 24 horas más tarde son inyectados subcutáneamente en la base de la cola con 50  $\mu\text{g}$  de OVA 323-339 en adyuvante completo de Freund H37Ra. Estas dos inyecciones se repiten 6 y 7 días más tarde. Siete días después de la terminación del segundo grupo de inyecciones, los ratones son sacrificados. Los nódulos linfáticos inguinales y paraaórticos se extirpan y se convierten en una suspensión de células simples.

La suspensión se agota de células que presentan antígeno mediante incubación sobre lana de nailon y columnas Sephadex G-10, y las poblaciones de células T purificadas resultantes se incuban con APCs sometidas a impulsos con el péptido OVA 323-339. Células B esplénicas sirven como células que presentan antígeno. Estas células se fijan con mitomicina C (de 50 a 100  $\mu\text{g/ml}$  en una suspensión de  $4 \times 10^6$  esplenocitos/ml) para inhibir la proliferación de las células B, se lavan intensivamente y se añaden a células T purificadas con diversas concentraciones del péptido OVA 323-339. El ensayo de proliferación se lleva a cabo en placas de microvaloración de fondo redondo de 96 pocillos a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%, durante 3-5 días. Los pocillos se someten a impulsos con 1  $\mu\text{Ci}$  de <sup>3</sup>H-timidina 18 horas antes de la terminación de los cultivos y se recogen usando un recogedor de células Skatron. La incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en DNA como una medida de la proliferación de células T se determina usando un espectrómetro de centelleo de líquidos LKB. El grado de proliferación de células T reactivas con péptido es indicativo de las respuestas de células T<sub>H</sub> (es decir de la expansión clonal) que tienen lugar en los ratones después de la inmunización.

#### Ejemplo 24

*Sistema inmunosupresor mediante inoculación de DNA con vectores que expresan moléculas del MHC monocatenarias conectadas a péptido, de la invención*

Un ejemplo de un sistema modélico para probar los efectos del sistema de inoculación de DNA (particularmente intramuscular o intradérmico) se esboza como sigue. Tres grupos de ratones BLB/c son inyectados intramuscularmente (IM) en ambas patas traseras con 100  $\mu\text{g}$  de: (1) SCE1, (b) SCT1 o (c) solución salina. Las inyecciones se administrarán a las 0, 2 y 4 semanas. A las 4 y 5 semanas después de la inyección de DNA inicial, el péptido OVA 323-330 (100  $\mu\text{g/ratón}$  en adyuvante completo de Freund H37Ra) se inyecta subcutáneamente en la base de la cola. Dos semanas más tarde (semana 8), se recoge sangre de cada ratón mediante sangrado de la cola y se obtiene suero después de la centrifugación a aproximadamente 14.000 G durante 3-5 minutos. Las valoraciones de anticuerpos de IgG e IgM específicos de OVA se determinan como se describe anteriormente. El grado de anticuerpo de IgG específico para OVA es indicativo del cambio de la clase de inmunoglobulina dirigido a células T<sub>H</sub> que tiene lugar en los ratones después de la inmunización con el péptido. Por lo tanto, la inoculación de DNA con los vectores de expresión del MHC monocatenarios conectados a péptido puede provocar una reducción en el nivel de anticuerpos de IgG específicos para el péptido sin afectar a los niveles de anticuerpo de IgM.

Un ensayo alternativo es medir la expansión o proliferación clonal de células T<sub>H</sub> específicas para OVA. Brevemente, se preparará una suspensión de células a partir de los nódulos linfáticos inguinales y paraaórticos 7 días después de la segunda inmunización con OVA. La suspensión se agota de células que presentan antígeno mediante incubación sobre lana de nailon y columnas Sephadex G-10, y las poblaciones de células T purificadas resultantes se incuban con

## ES 2 152 424 T5

APCs sometidas a impulsos con el péptido OVA 323-339. Las células B esplénicas sirven como células que presentan antígeno. Estas células se fijan con mitomicina C (de 50 a 100  $\mu\text{g/ml}$  en una suspensión de  $4 \times 10^6$  esplenocitos/ml) para inhibir la proliferación de las células B, se lavan intensivamente y se añaden a células T purificadas con diversas concentraciones del péptido OVA 323-339. El ensayo de proliferación de células T específicas para OVA se lleva a cabo como se describe anteriormente. El grado de proliferación de células T reactivas frente al péptido es indicativo de las respuestas de células  $T_H$  (es decir de la expansión clonal) que tienen lugar en los ratones después de la inmunización con el péptido. Por lo tanto, la inoculación de DNA con los vectores de expresión del MHC monocatenarios conectados a péptido puede provocar una reducción en el nivel de proliferación de células  $T_H$  específicas para el péptido.

La invención se ha descrito con referencia a modalidades preferidas de la misma. Sin embargo, se apreciará que los expertos en la técnica, al considerar esta descripción, pueden hacer modificaciones y mejoras dentro del espíritu y el alcance de la invención.

# REIVINDICACIONES

1. Un complejo de fusión del MHC que comprende una molécula de MHC clase II que contiene una ranura que se une a péptido, y un péptido de presentación conectado covalentemente a la molécula del MHC,

en el que las subunidades de cadena  $\alpha$  y  $\beta$  están conectadas como una proteína de fusión monocatenaria con el péptido de presentación,

en el que el péptido de presentación y el complejo de fusión son capaces de modular la actividad de un receptor de células T para inducir la proliferación de células T,

en el que una secuencia conectora se interpone entre la molécula del MHC y el péptido de presentación,

en el que una segunda secuencia conectora ("secuencia conectora monocatenaria") se usa para conectar las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  y

en el que ambas secuencias conectoras son flexibles para permitir el plegamiento de la molécula monocatenaria hasta una forma activa.

2. Una construcción de DNA que codifica para el complejo de fusión del MHC de acuerdo con la reivindicación 1.

3. Un método para la identificación de un péptido que puede modular la actividad de células T para inducir la proliferación de células T, que comprende:

introducir en células huésped vectores de clonación que contienen cada uno construcciones de DNA que codifican para un complejo de fusión del MHC de acuerdo con la reivindicación 1;

cultivar las células huésped bajo condiciones adecuadas para la expresión del complejo de fusión del MHC; y

seleccionar células huésped que expresan el complejo de fusión del MHC que modula la actividad de células T.

4. Un vector de expresión recombinante simple que comprende DNA que codifica para las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del complejo de fusión del MHC de acuerdo con la reivindicación 1,

y opcionalmente también codifica para un factor coestimulante de células T.

5. El uso de 1) una secuencia de DNA que comprende la construcción de acuerdo con la reivindicación 2, ó 2) una secuencia de DNA que codifica para una molécula monocatenaria de acuerdo con la reivindicación 1,

para la preparación de un agente para inducir una respuesta inmunitaria que comprende proliferación de células T en un mamífero, preferiblemente para vacunar a un mamífero contra un trastorno elegido.

6. El uso de un complejo de fusión del MHC de acuerdo con la reivindicación 1, para la preparación de una composición farmacéutica para inducir una respuesta inmunitaria que comprende proliferación de células T.

7. Composición farmacéutica que comprende al menos un complejo de fusión del MHC de acuerdo con la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.

Figura 1A. Construcción péptido-conector-cadena  $\beta$

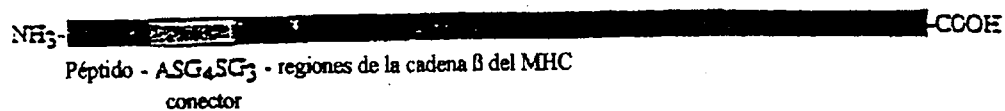


Figura 1B. Vista esquemática de la ranura de unión del MHC conectado a péptido

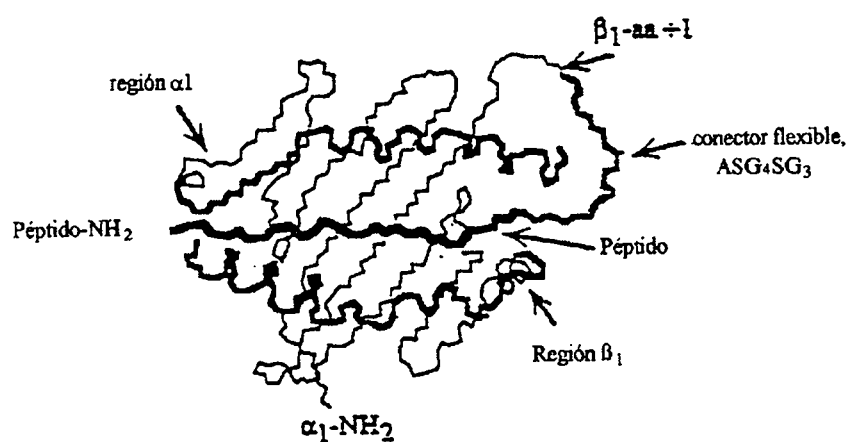


Figura 1C. Vista esquemática de la proteína de fusión soluble de MHC conectado a péptido-región C de IgG

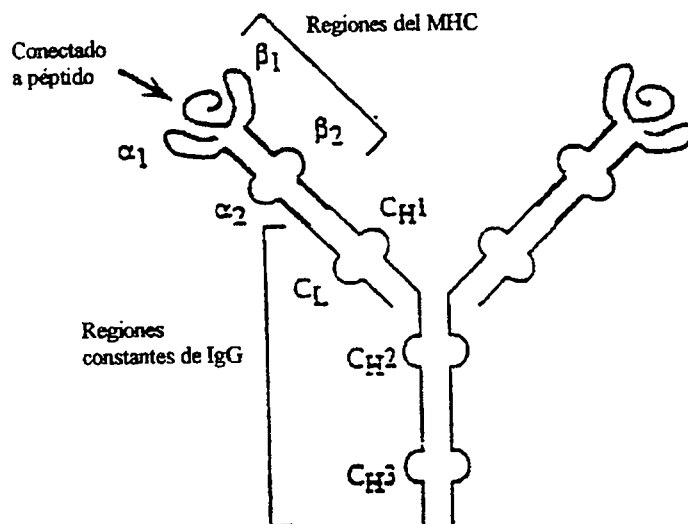


Figura 2: Esquema de clonación de la cadena  $\alpha$  de I-A<sup>d</sup>

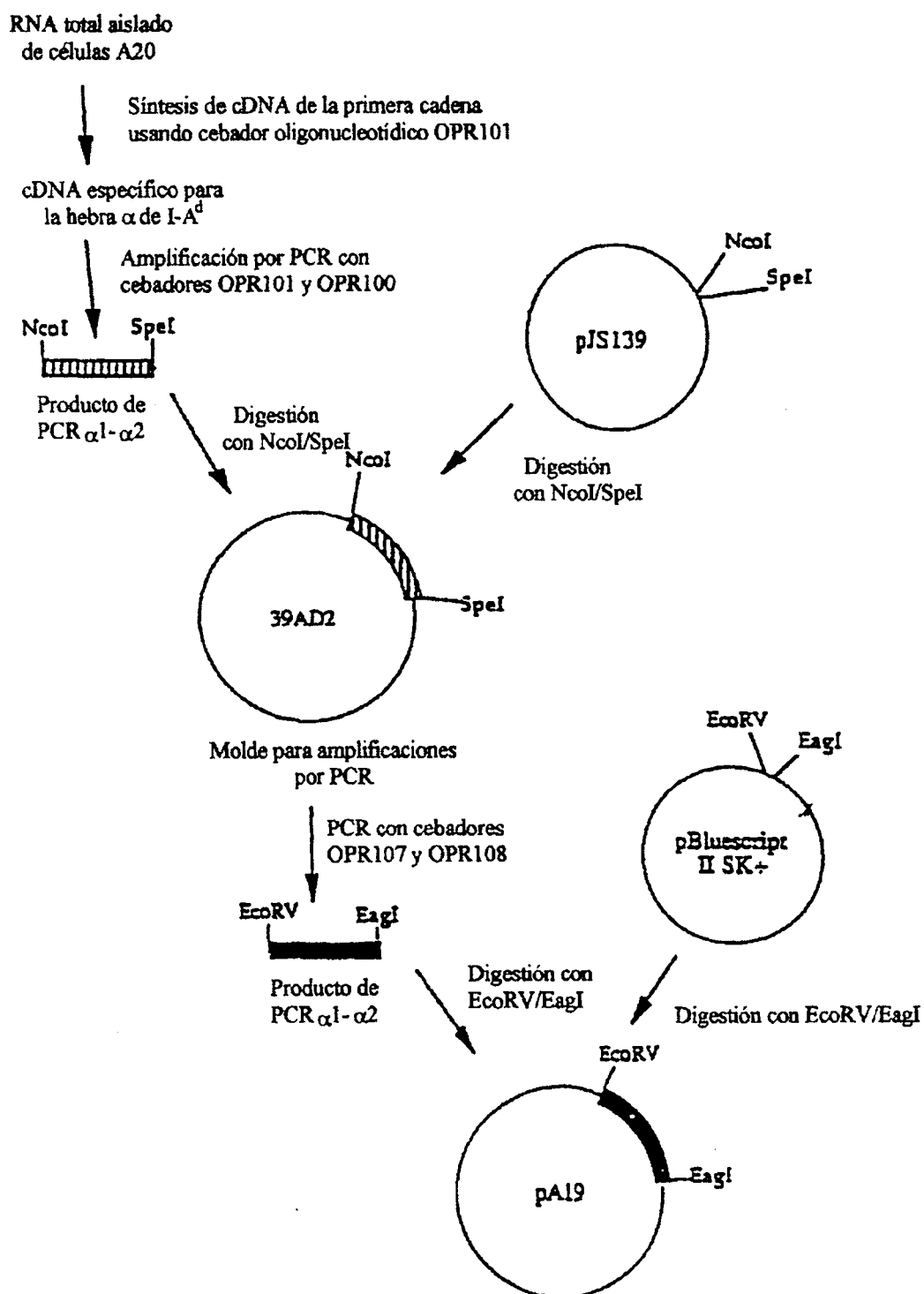


Figura 3: Esquema de clonación de la cadena  $\beta$  de I-A<sup>d</sup>

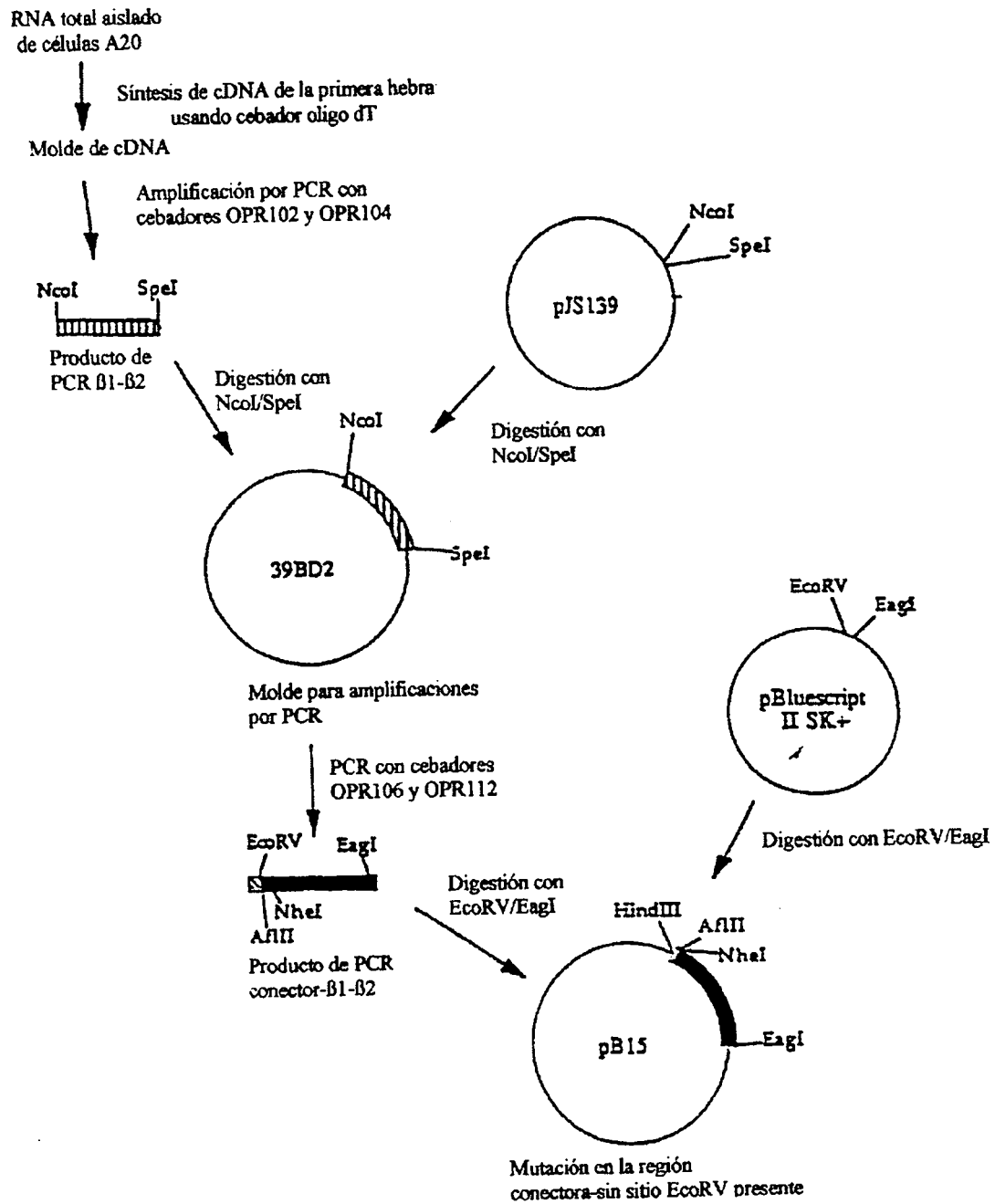


Figura 3: continuación

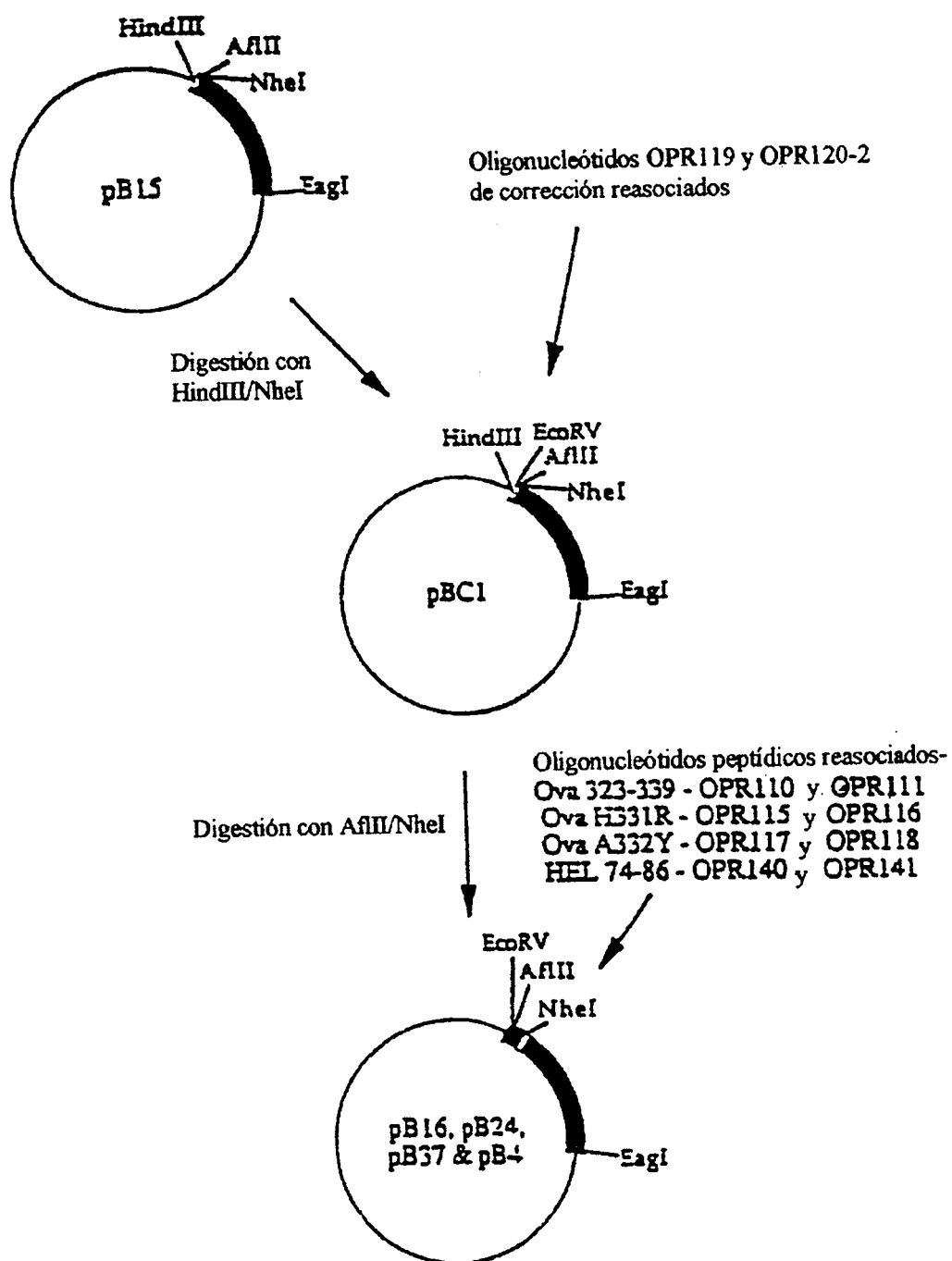


Figura 4: Esquema de clonación de la cadena  $\alpha$  de HLA-DR1

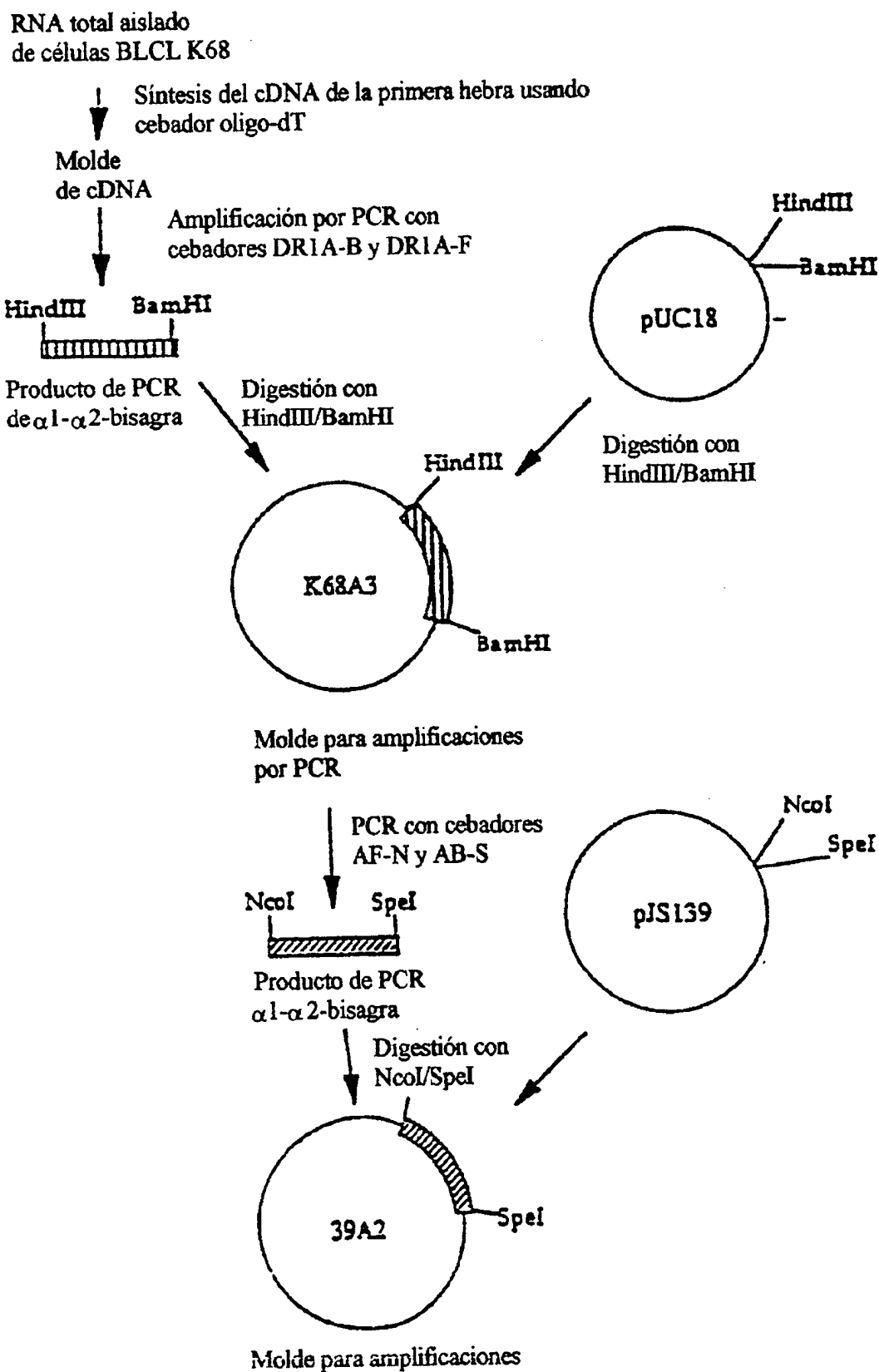


Figura 4: continuación

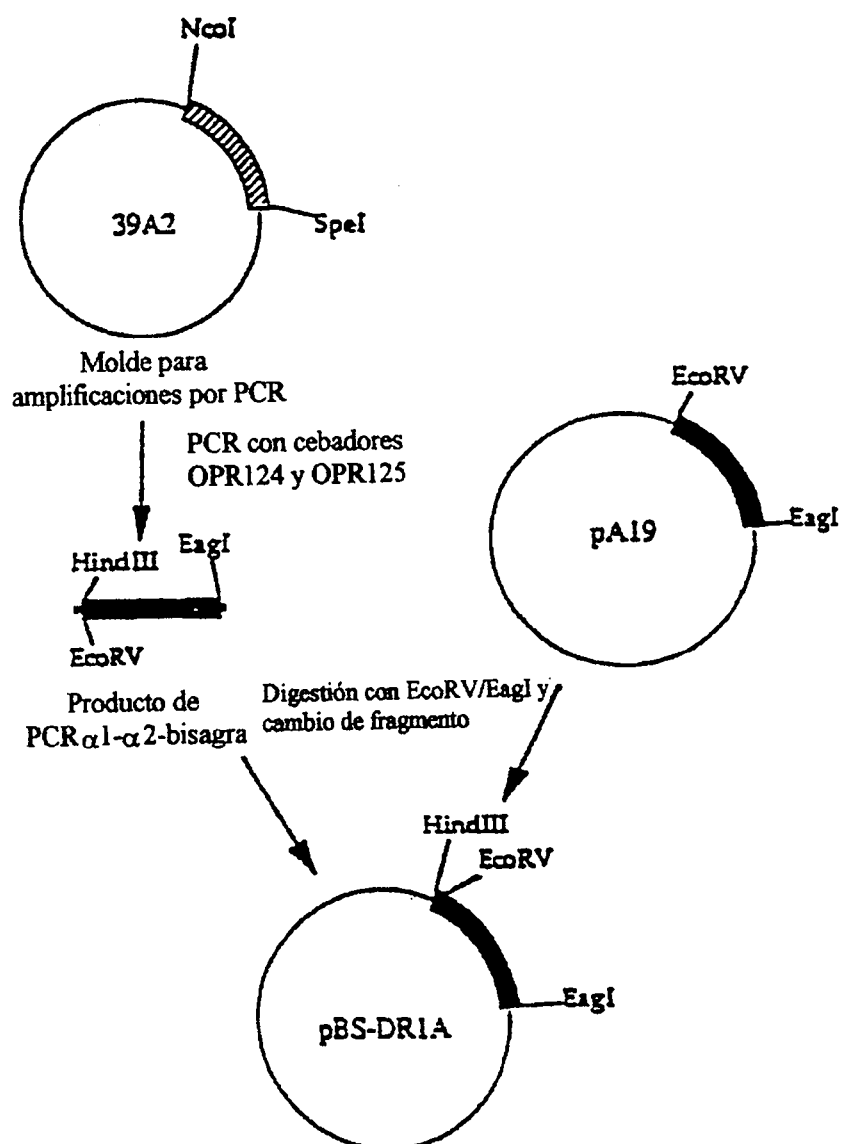


Figura 5: Esquema de clonación de la cadena  $\beta$  de HLA-DR1

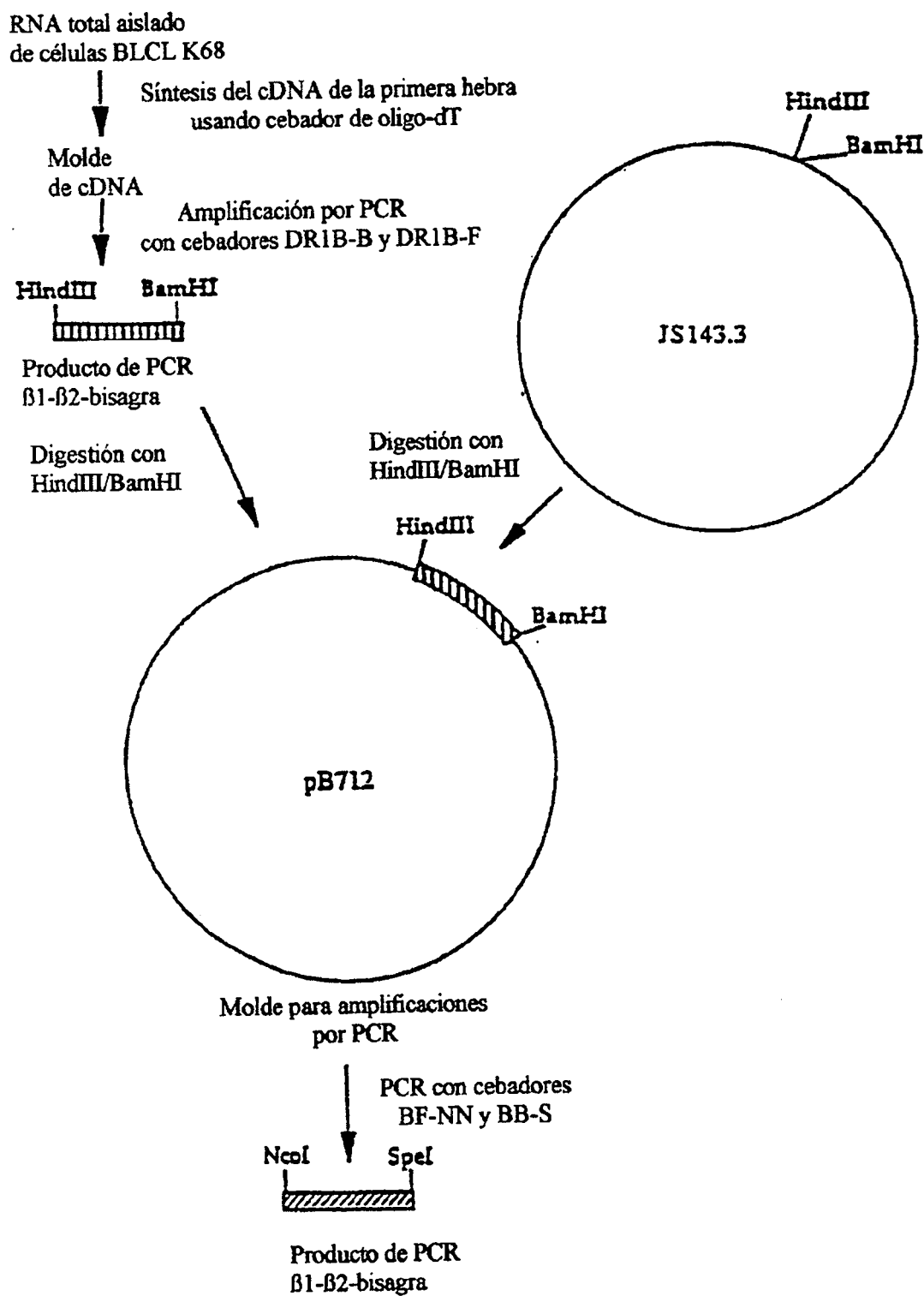


Figura 5: continuación

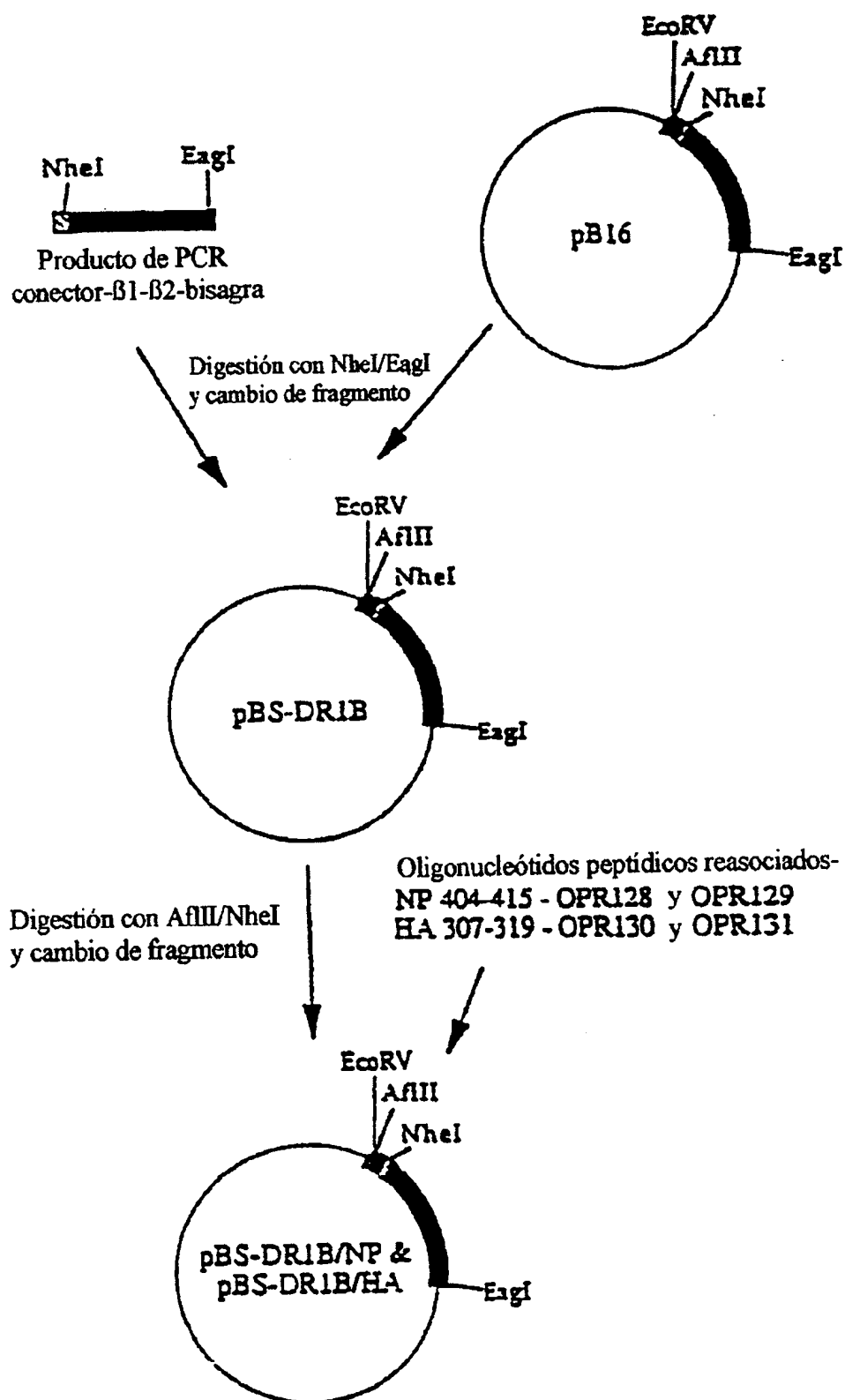


Figura 5: continuación

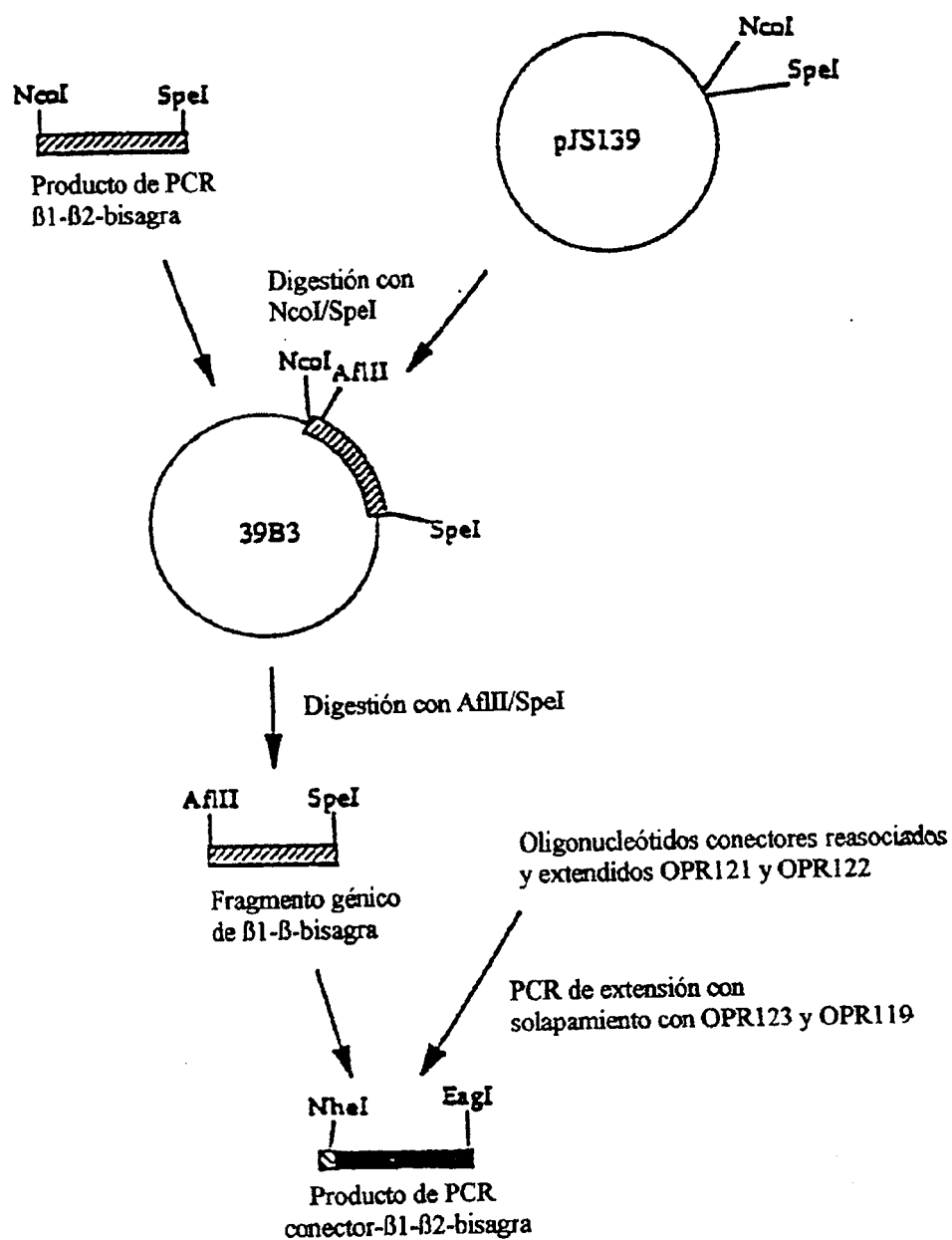


Figura 6: Esquema de clonación de la cadena  $\alpha$  de I-A<sup>s</sup>

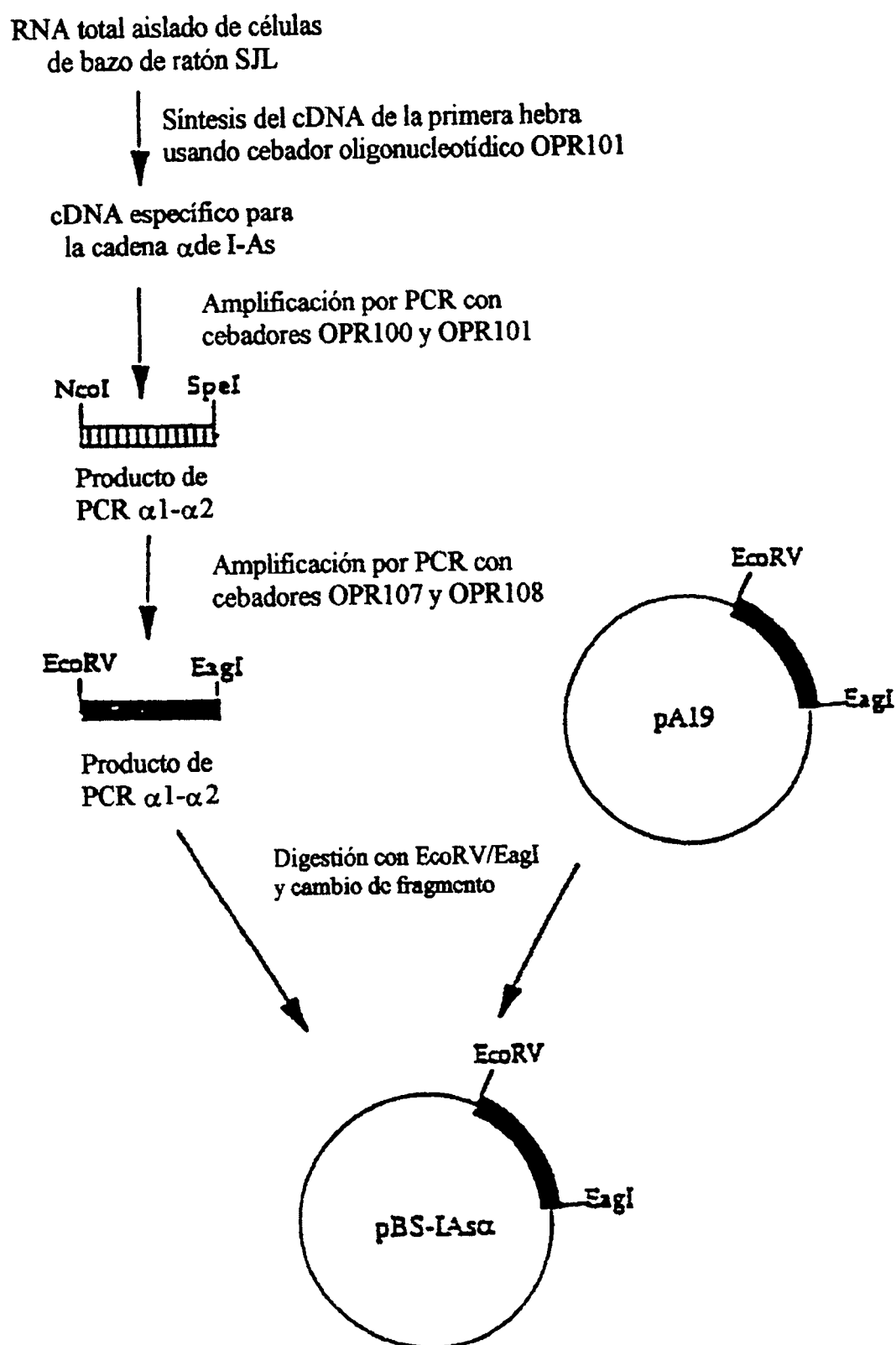




Figura 8 - Oligonucleótidos usados para construir vectores del MHC

Cebadores de PCR y oligonucleótidos de clonación de I-A<sup>d</sup>/I-A<sup>s</sup> (los sitios de restricción están subrayados)

OPR100

5'-GGG GGG GCC ATG GCC GAA GAC GAC ATT GAG GCC GAC-3'

OPR101

5'-GGG GCG ACT AGT CCA GTG TTT CAG AAC CGG CTC-3'

OPR107

5'-CCC CCC GAT ATC TCA GCT TCC AGC AGT GGA GAC GAC ATT GAG  
GCC G-3'

OPR108

5'-CCC CCC CGG CCG CTA CTT ACG TTT CCA GTG TTT CAG AAC CGG  
C-3'

OPR102

5'-GGG GGG GCC ATG GCC GGA AAC TCC GAA AGG CAT TTC G-3'

OPR104

5'-GGG GCG ACT AGT CCA CTC CAC AGT GAT GGG GC-3'

OPR106

5'-CCC CCC CGG CCG TAC CTG AGG ACC ACT CCA CAG TGA TGG-3'

OPR112

5'-CCC CCC GAT ATC ACA GGT GTC TTA AGT GCT AGC GGA GGG GGC  
GGA AGC GGC GGA GGG GGA AAC TCC GAA AGG CAT TTC-3'

OPR119

5'-AGC TTG ATA TCA CAG GTG TCT TAA GTG GAG-3'

OPR120-2

5'-CTA GCT CCA CTT AAG ACA CCT GTG ATA TCA-3'

VW310

5'-TCC GCA GGC GGC GGA GAC TCC GAA AGG CAT TTC G-3'

VW309

5'-CCA TCG CTA GCG GCG GTG GTG GTT CCG GTG GCG GCG GAG-3'

OPR136

5'-CCC CCC AGG CTT CCC GGG CCA CCA TGC CGT GCA GCA GAG CTC  
TG-3'

OPR139

5'-CCC CCC GAG CTC GAA TTC TCA TAA AGG CCC TGG GTG TCT G-3'

Figura 8 - continuación

OPR132

5'-CCC CCC AAG CTT CCC GGG CCA CCA TGG CTC TGC AGA TCC CCA  
GC-3'

OPR133

5'-CCC CCC ACT TAA GGT CCT TGG GCT GCT CAG CAC C-3'

OPR134

5'-CCC CCC CCA TCA CTG TGG AGT GGA GGG-3'

OPR135

5'-CCC CCC GAG CTC GAA TTC TCA CTG CAG GAG CCC TGC TGG-3'

Cebadores de PCR y oligonucleótidos de clonación de HLA-DR1

DR1A-F

5'-GGG GGG AAG CTT ATG ATC AAA GAA GAA CAT GTG ATC ATC-3'

DR1A-B

5'-GCC GCG GGA TCC GTT CTC TGT AGT CTC TGG GAG AGG-3'

DR1B-F

5'-GGG GGG AAG CTT ATG GGG GAC ACC CGA CCA CGT TTC TTG TGG  
CAG C-3'

AF-N

5'-GGG GGG GCC ATG GCC ATC AAA GAA GAA CAT GTG ATC ATC-3'

AB-S

5'-GCC GCG ACT AGT GTT CTC TGT AGT CTC TGG GAG AGG-3'

OPR124

5'-GGG GGG AAG CTT GAT ATC TCA GCT TCC AGC AGT AGT ATC AAA  
GAA GAA CAT GTG ATC-3'

OPR125

5'-GGG GGG CGG CCG CTA CTT ACG TTT CTC TGG GAG AGG GCT TGG  
AGC-3'

DR1B-B

5'-GCC GCG GGA TCC CTT GCT CTG TGC AGA TTC AGA CC-3'

BF-NN

5'-GGG GGG GCC ATG GCC GGA TCC GCT AGC GGG GAC ACC CGA CCA  
CGT TTC TTG-3'

Figura 8 - continuación

BB-S

5'-GCG GCG ACT AGT CTT GCT CTG TGC AGA TTC AGA CCG-3'

OPR121

5'-GTT GTC TTA AGT GGA GCT AGC GGA GGG GGC GGG TCC GGA GGT  
GGT GGG GAC ACC CG-3'

OPR122

5'-GAA ATG ACA TTC AAA CTT CAG CTG CCA CAA GAA ACG TGG TCG  
GGT GTC CCC ACC ACC-3'

OPR123

5'-GGG GGG CGG CCG TAC CTG AGG ACT TGC TCT GTG CAG ATT CAG-  
3'

Oligonucleótidos peptídicos

Ova 323-339

OPR110

5'-TTA AGT ATC TCT CAG GCT GTT CAC GCT GCT CAC GCT GAA ATC  
AAC GAA GCT GGT CGT G-3'

OPR111

5'-CTA GCA CGA CCA GCT TCG TTG ATT TCA GCC TGA GCA GCG TGA  
ACA GCC TGA GAG ATA C-3'

Ova H331R

OPR115

5'-TTA AGT ATC TCT CAG GCT GTT CAC GCT GCT CGG GCT GAA ATC  
AAC GAA GCT GGT CGT G-3'

OPR116

5'-CTA GCA CGA CCA GCT TCG TTG ATT TCA GCC CGA GCA GCG TGA  
ACA GCC TGA GAG ATA C-3'

Ova A332Y

OPR117

5'-TTA AGT ATC TCT CAG GCT GTT CAC GCT GCT CAC TAC GAA ATC  
AAC GAA GCT GGT CGT G-3'

OPR116

5'-CTA GCA CGA CCA GCT TCG TTG ATT TCA TAG TGA GCA GCG TGA  
ACA GCC TGA GAG ATA C-3'

Figura 8 - continuación

HEL 74-86

OPR140

5' - TTA AGT AAC CTG TGC AAC ATC CCC TGC AGC GCC CTG CTG AGC  
TCC G-3'

OPR141

5' - CTA GCG GAG CTC AGC AGG GCG CTG CAGBGGG ATG TTG CAC AGG  
TTA C-3'

NP 404-415

OPR128

5' - TTA AGT CAG ATC AGC GTG CAG CCC GCC TTC AGC GTG CAG G-3'

OPR129

5' - CTA GCC TGC ACG CTG AAG GCG GGC TGA ACG CTG ATC TGA C-3'

HA 307-319

OPR130

5' - TTA AGT CCC AAG TAC GTG AAG CAG AAC ACC CTG AAG CTG GCC  
ACC G-3'

OPR131

5' - CTA GCG GTG GCC AGC TTC AGG GTG TTC TGC TTC ACG TAC TTG  
GGA C-3'

MBP 91-103

VW315

5' - TTA AGT CAC TAT GGC TCC CTG CCG CAG AAG TCC CAG CAC GGG  
CGC G-3'

VW316

5' - CTA GCG CGC CCG TGC TGG GAC TTC TGC GGC AGG GAG CCA TAG  
TGA C-3'

PLP 139-151

VW313

5' - TTA CAT CAC TCC CTG GGC AAG TGG CTG GGC CAC CCG GAC AAG  
TTC G-3'

VW314

5' - CTA GCG AAC TTG TTC GGG TGG CCC AGC CAC TTG CCC AGG GAG  
TGA C-3'

Figura 8 - continuación

MBP 1-14

VW317

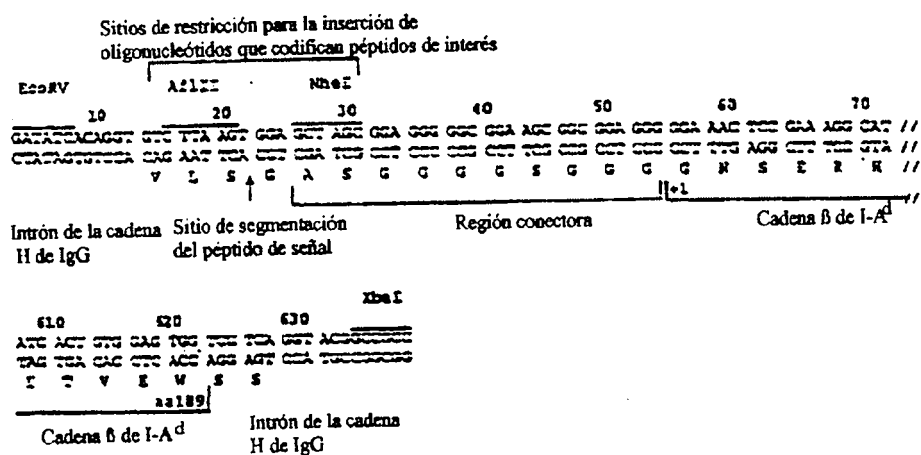
5' - TTA AGT ATG GCA TCC CAG AAG CGC CCG TCC CAG CGC TCC AAG  
TAC CTG G -3'

VW316

5' - CTA GCC AGG TAC TTG GAG CGC TGG GAC GGG CGC TTC TGG GAT  
GCC ATA C -3'

1000V 10 20 30 40 50 550 560 570 580 XbaI  
 TGC AGC AGT GAA GAC GAG ATT GAG GCG GAC GAC // GCG GTT GCG AAA GAG TGG AAA CCG AAGTACGCGCG  
 CCGTATGATGTTA AGC TGC TGA CTA GCG TAA CCG CCG GCG // GCG CAA GAC TTT GCG ACC TTT GCA TTTATGCGCGCG  
 S S S E D D C E A D N // F V L K M W K R  
 -1 aa182  
 Intrón de la cadena κ de IgG Sitio de segmentación del péptido de señal Cadena α de I-A<sup>d</sup> Intrón de la cadena κ de IgG

### Construcción soluble de la cadena $\beta$ de I-A



### Construcción soluble de la cadena a de I-A<sup>3</sup>

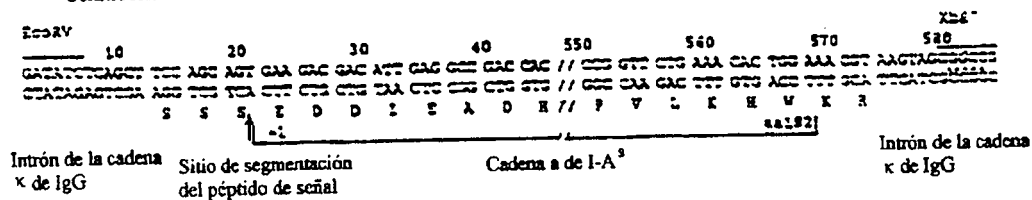


Figura 9 - continuación

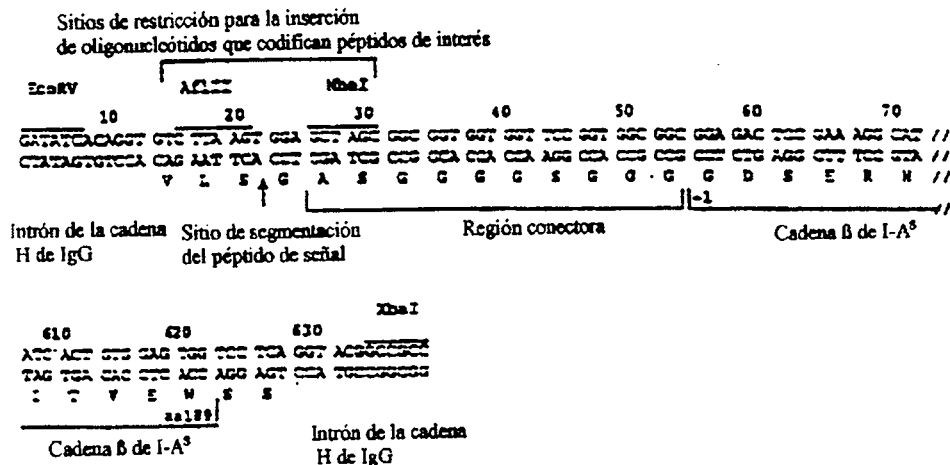
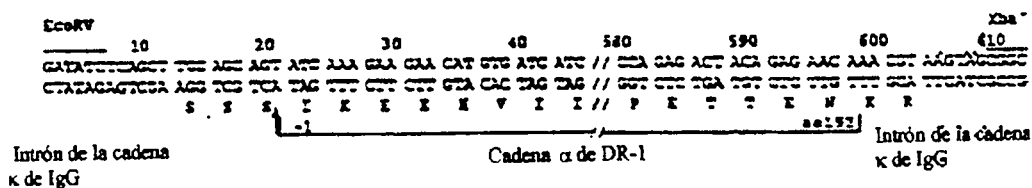
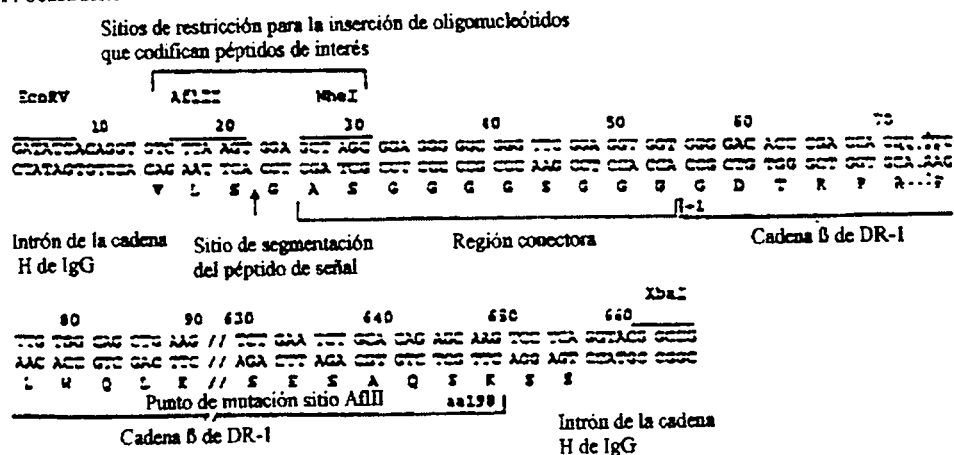
Figura 9D. Construcción soluble de la cadena  $\beta$  de I-A<sup>s</sup>Figura 9E. Construcción soluble de la cadena  $\alpha$  de HLA-DR1Figura 9F. Construcción soluble de la cadena  $\beta$  de HLA-DR1

Figura 10. Vectores de Expresión de Células de Mamífero Originales

Figura 10A

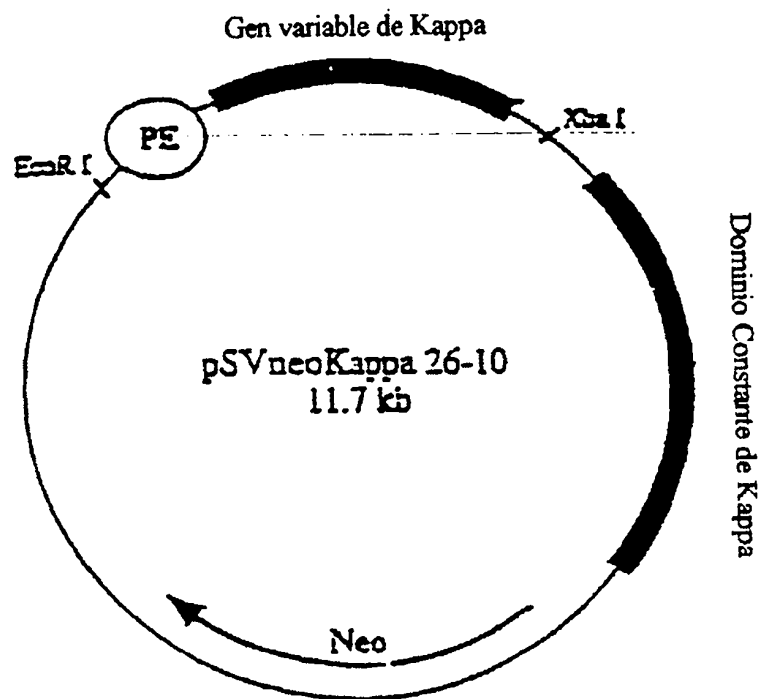


Figura 10B

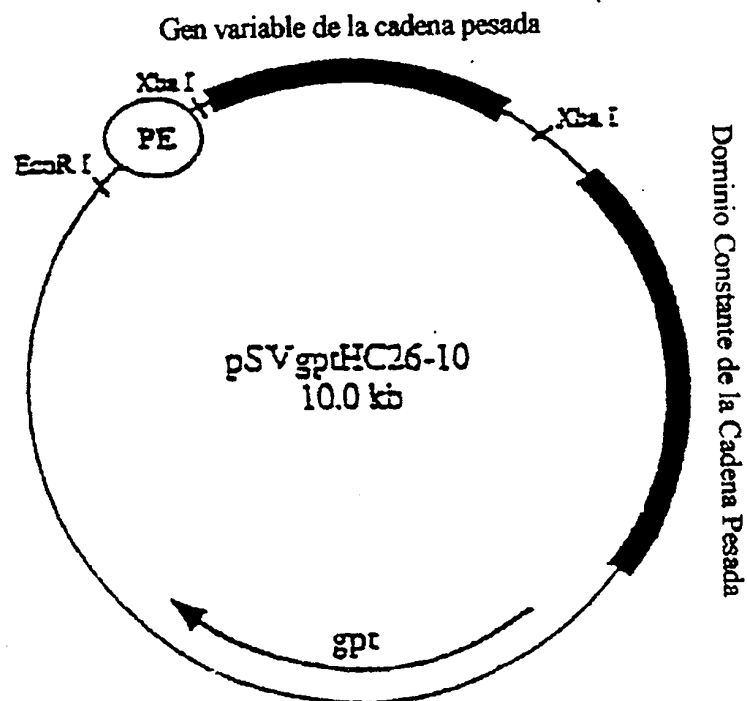


Figura 11. Las Construcciones Mutadas con EcoRV y EagI de Kappa de 2,7 Kb y de Cadena Pesada de 1,7 Kb

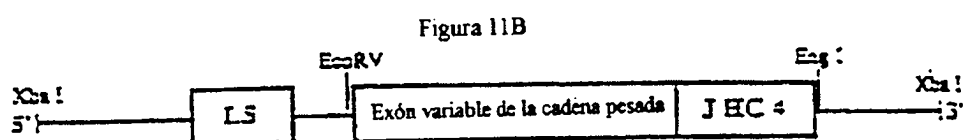
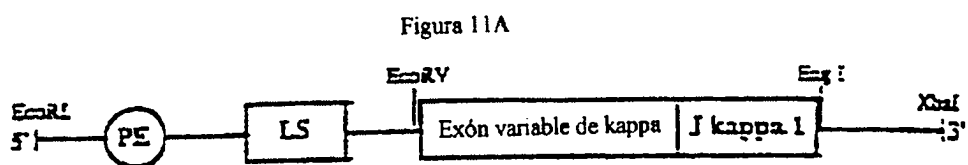


Figura 12. Mutagénesis Dirigida al Sitio por PCR para Introducir Sitios de Restricción EcoRV y EagI en el Inserto de 2,7 Kb de la Cadena Kappa

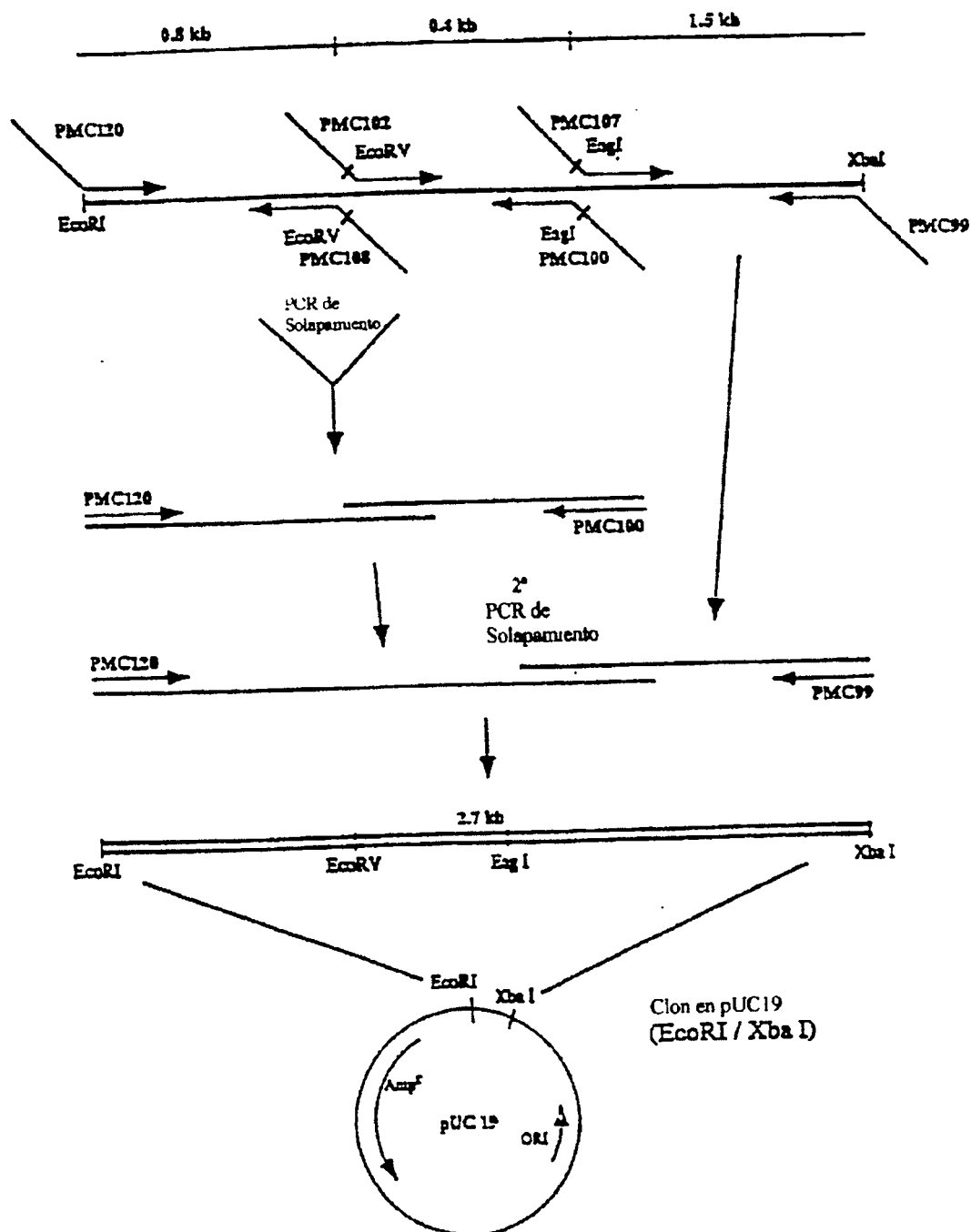


Figura 13. ESTRATEGIA PARA CONSTRUIR EL GEN DE MHC CLASE II $\alpha$ /CONSTANTE DE KAPPA EN VECTOR DE EXPRESION DE CELULAS DE MAMIFERO

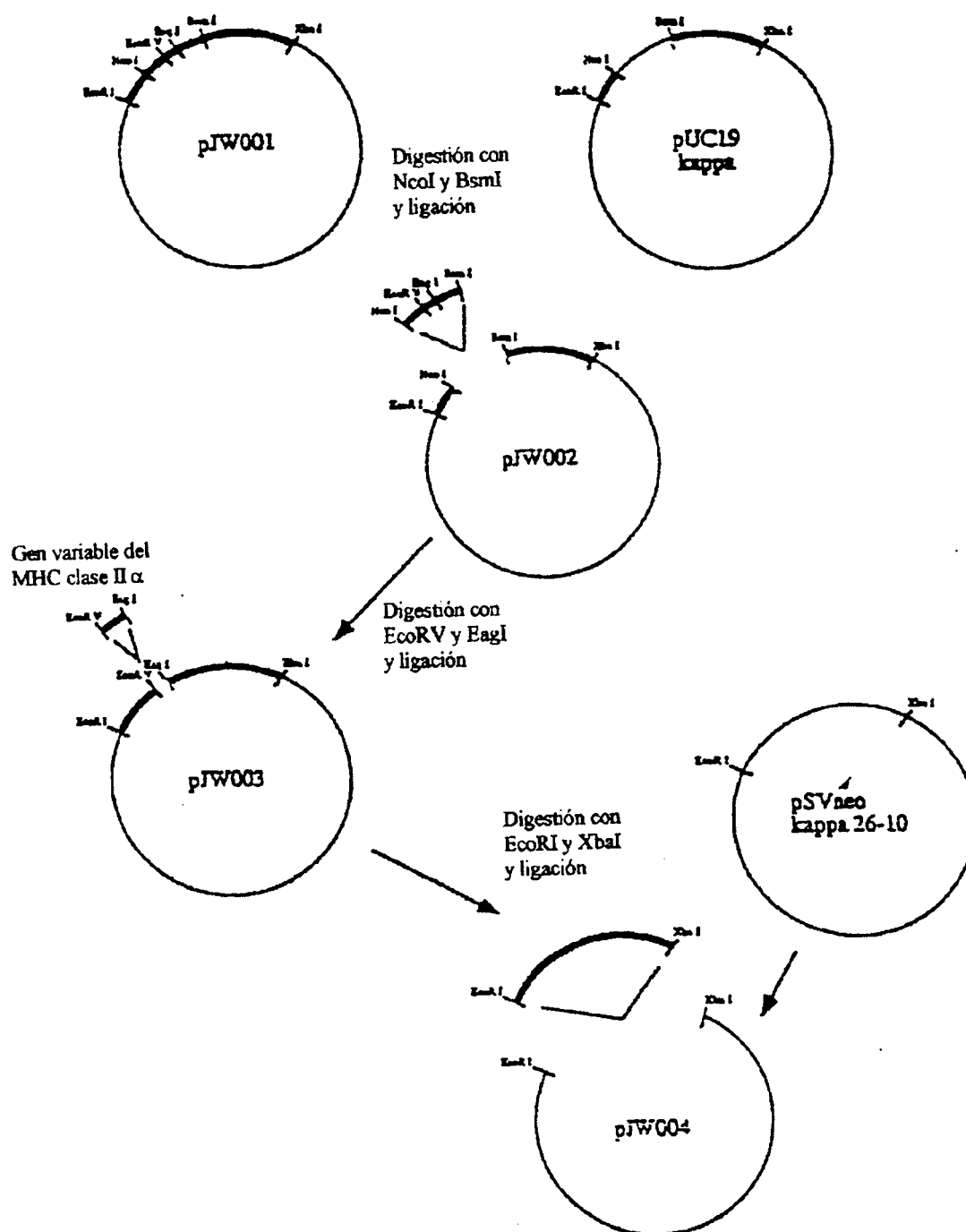


**Figura 14. Cebadores Usados para Someter a Secuenciación el Fragmento de 2,7 Kb Mutado**

| <u>Lista de Cebadores</u> | <u>Secuencia</u>                  |
|---------------------------|-----------------------------------|
| PMC-33                    | [5'GCTCAGCTGTCTTGTTTCAGTACTGATG'] |
| PMC-77                    | [5'GTAAGTAGCGGCCG3']              |
| PMC-111                   | [5'GGTATGTAAAAATAAACATCACAG3']    |
| PMC-114                   | [5'GCCTTGCTTACGGAGTTACTG']        |

Figura 15. Estrategia para Mutagénesis M13 y Clonación de los Genes Variables de B del MHC II

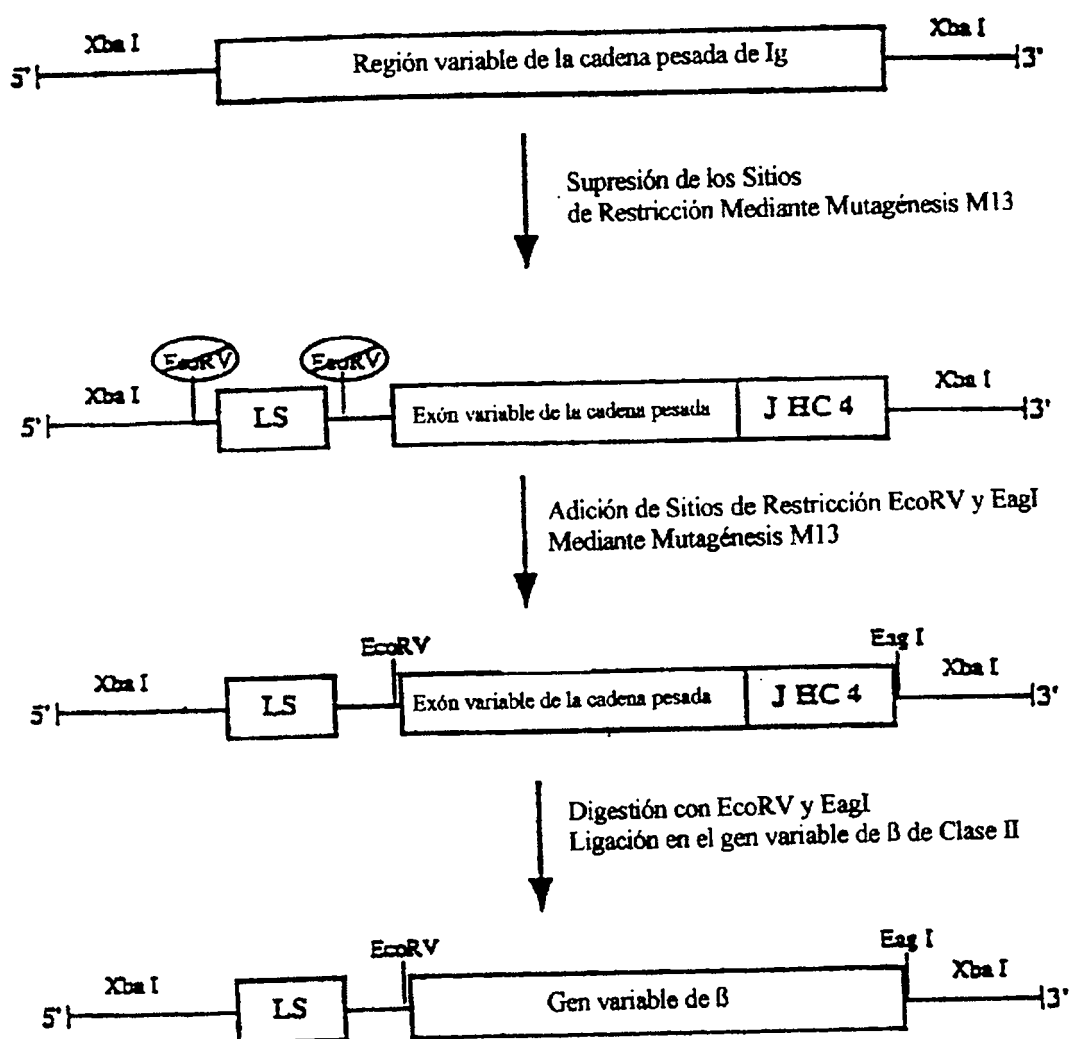


Figura 16. Vectores Finales para Expresar Proteínas Quiméricas de MHC II/Ig

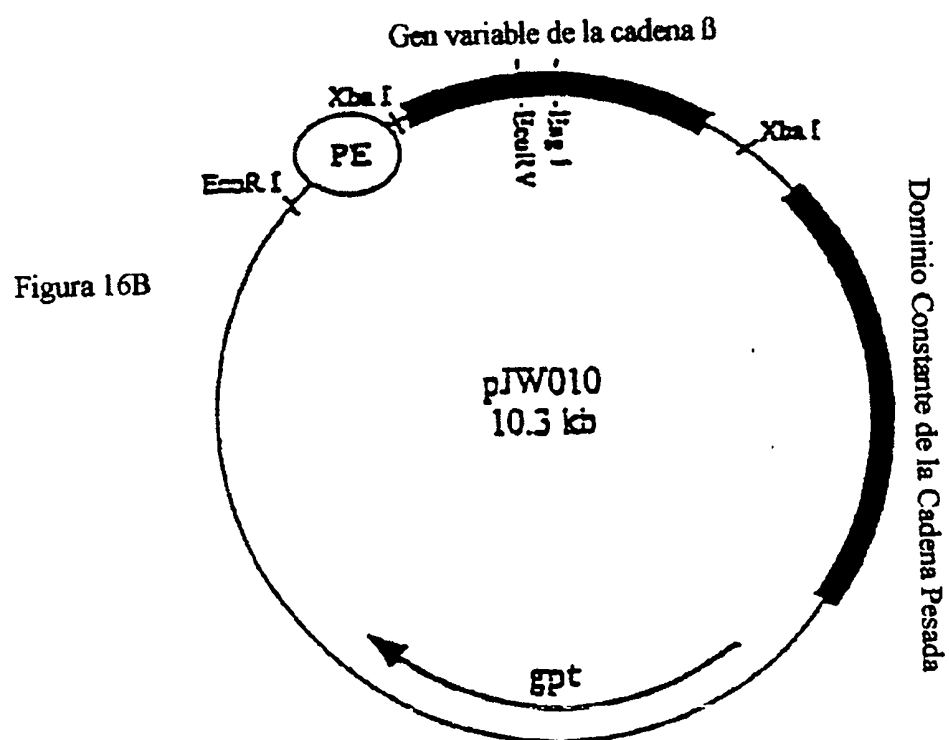
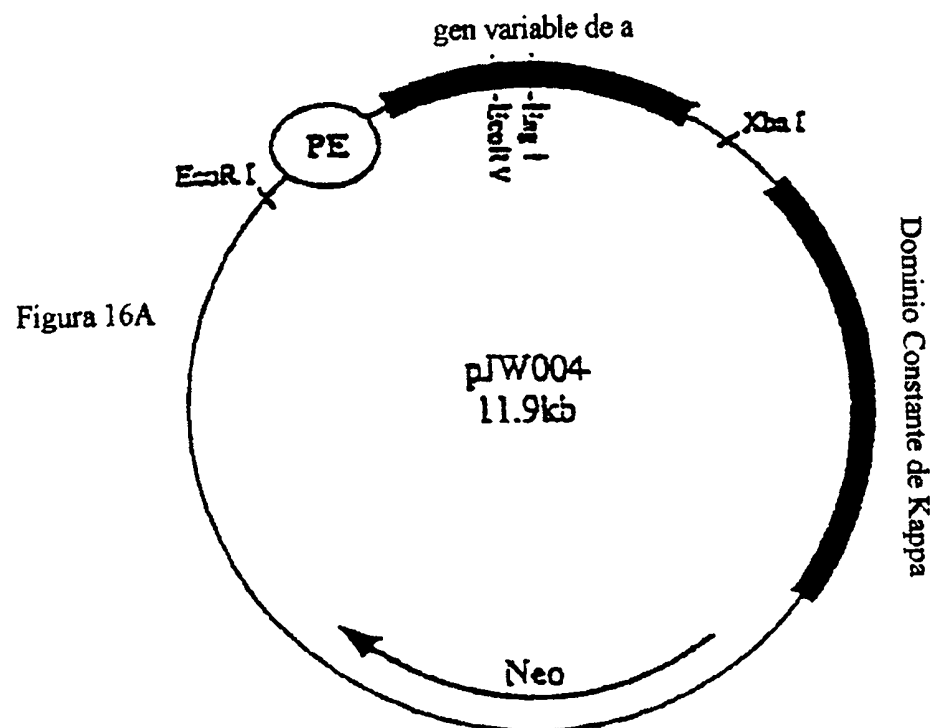


Figura 17 - Vectores de expresión de MHC conectado a péptido de longitud completa

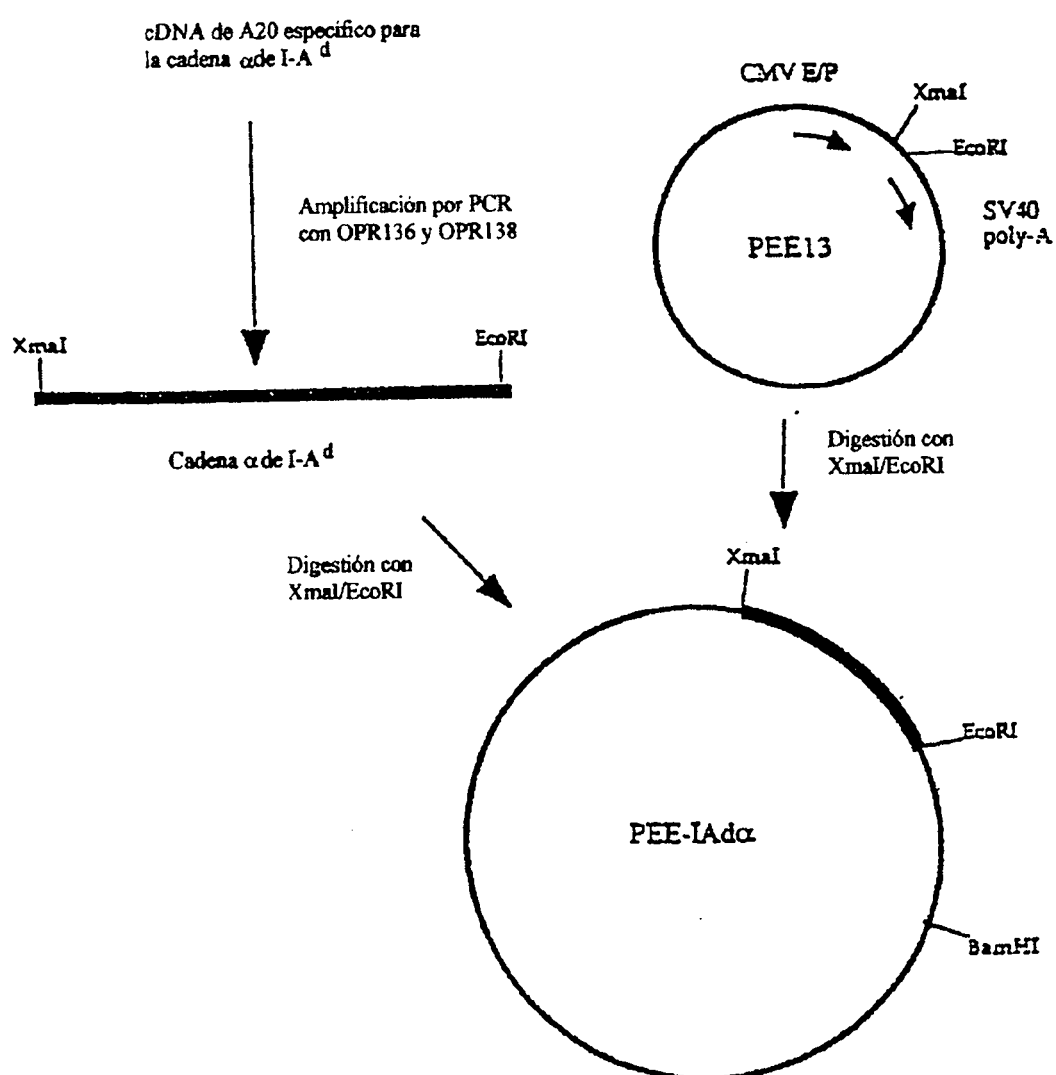


Figura 17 - continuación

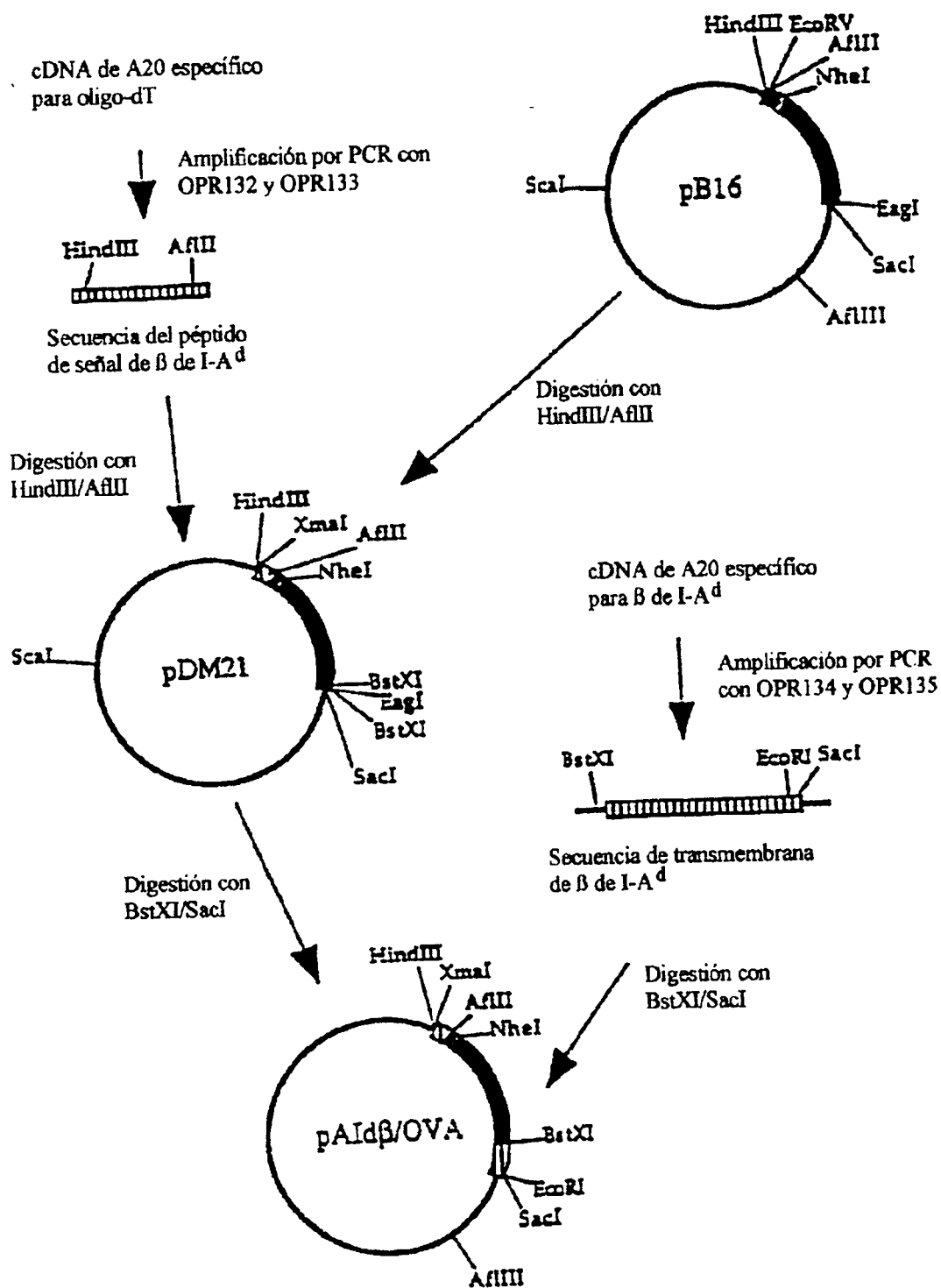


Figura 17 - continuación

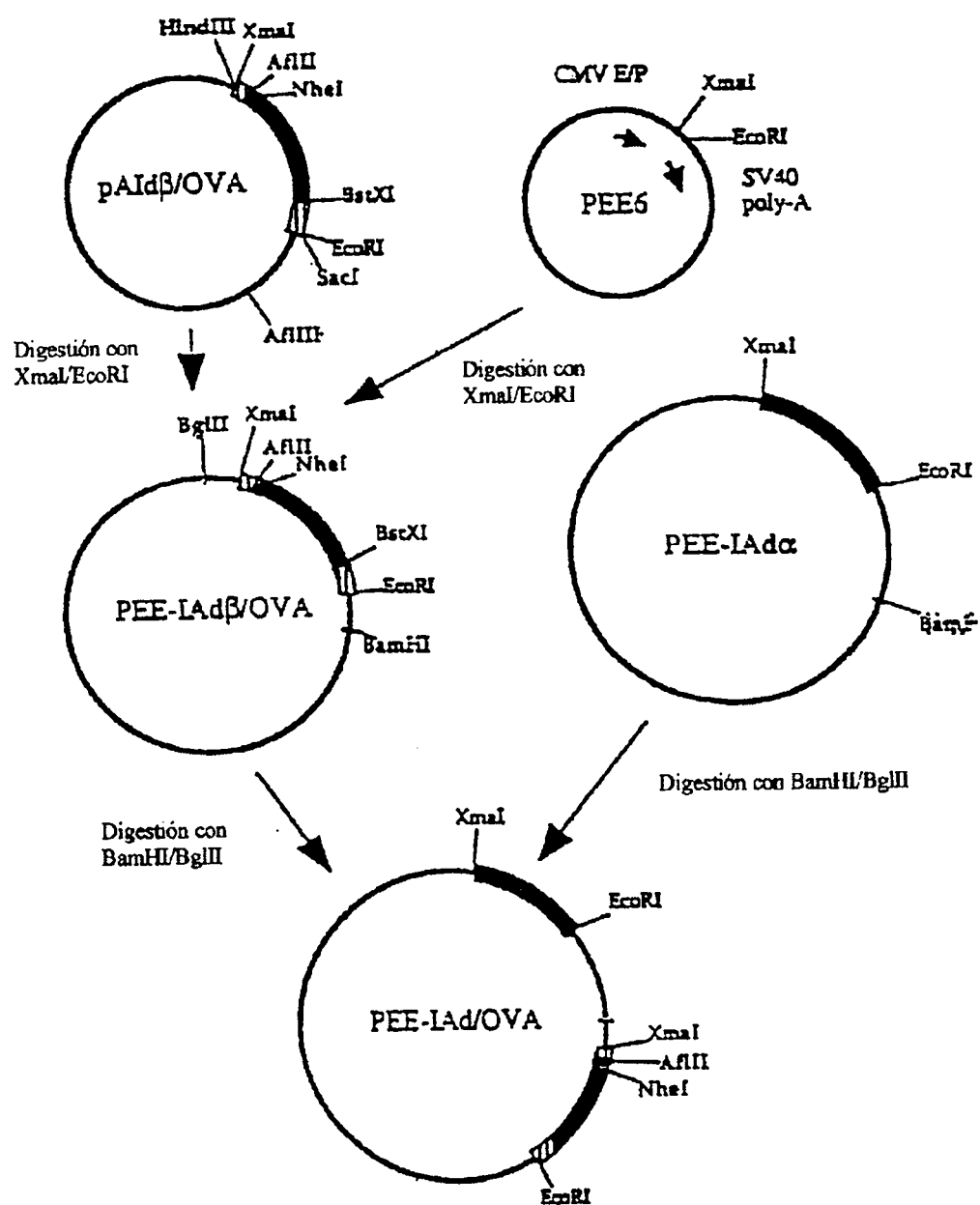


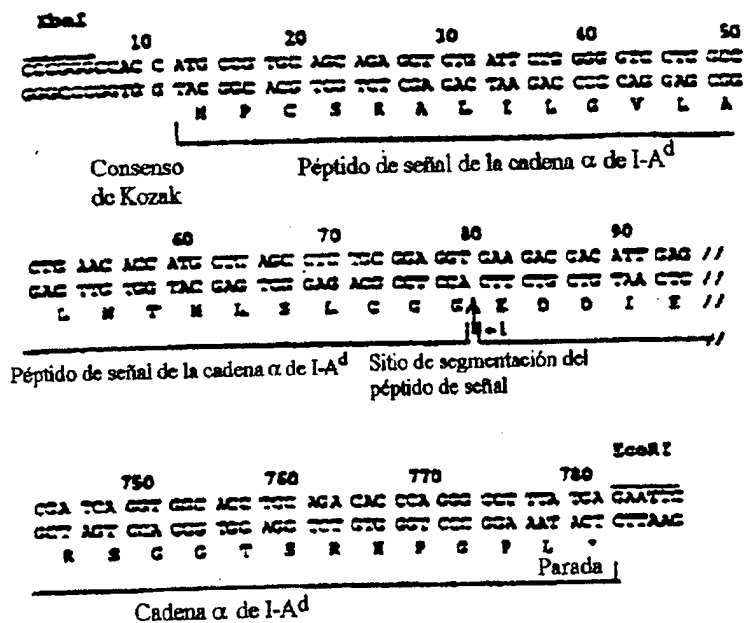
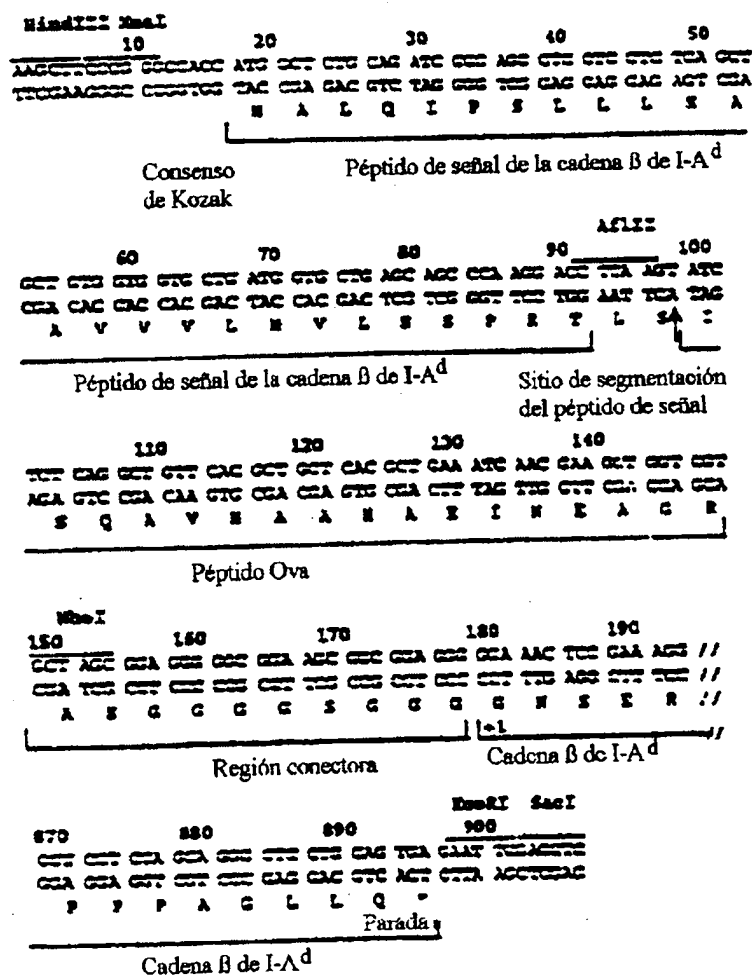
Figura 18A. Inserto de la cadena  $\alpha$  de I-A<sup>d</sup> de longitud completaFigura 18B. Inserto de la cadena  $\beta$  de I-A<sup>d</sup> de longitud completa

Figura 19 (Hoja 1 de 7)

Vectores de expresión del MHC conectado a péptido, de longitud completa

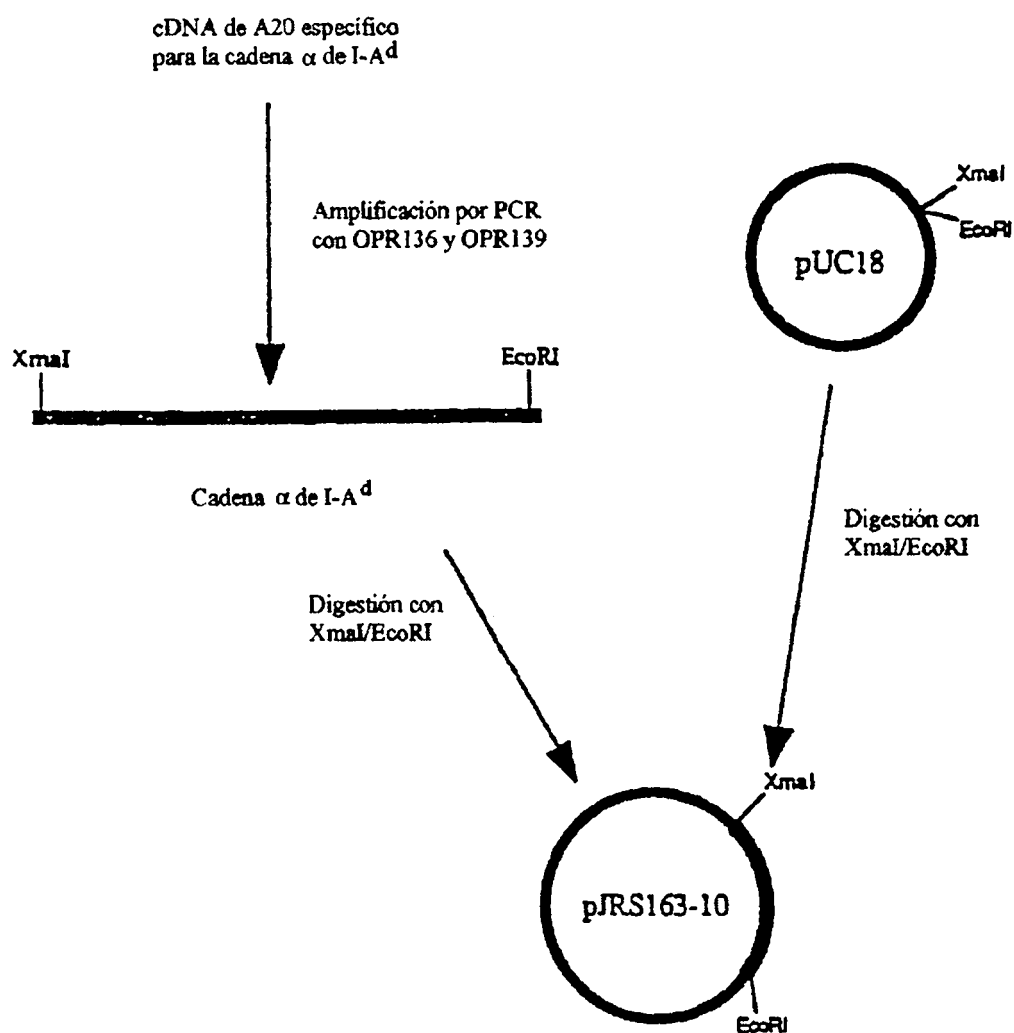


Figura 19 (Hoja 2 de 7)

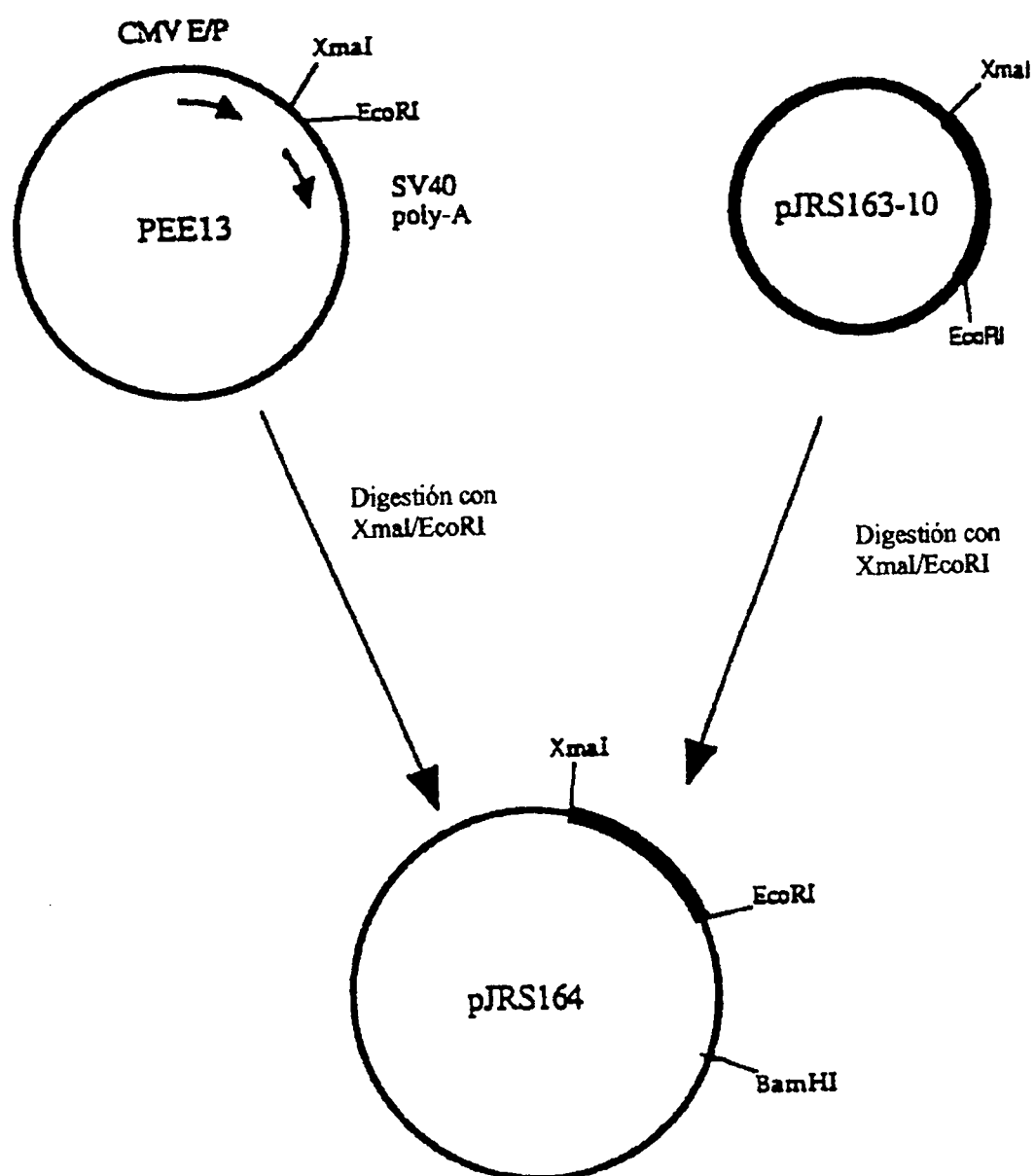


Figura 19 (Hoja 3 de 7)

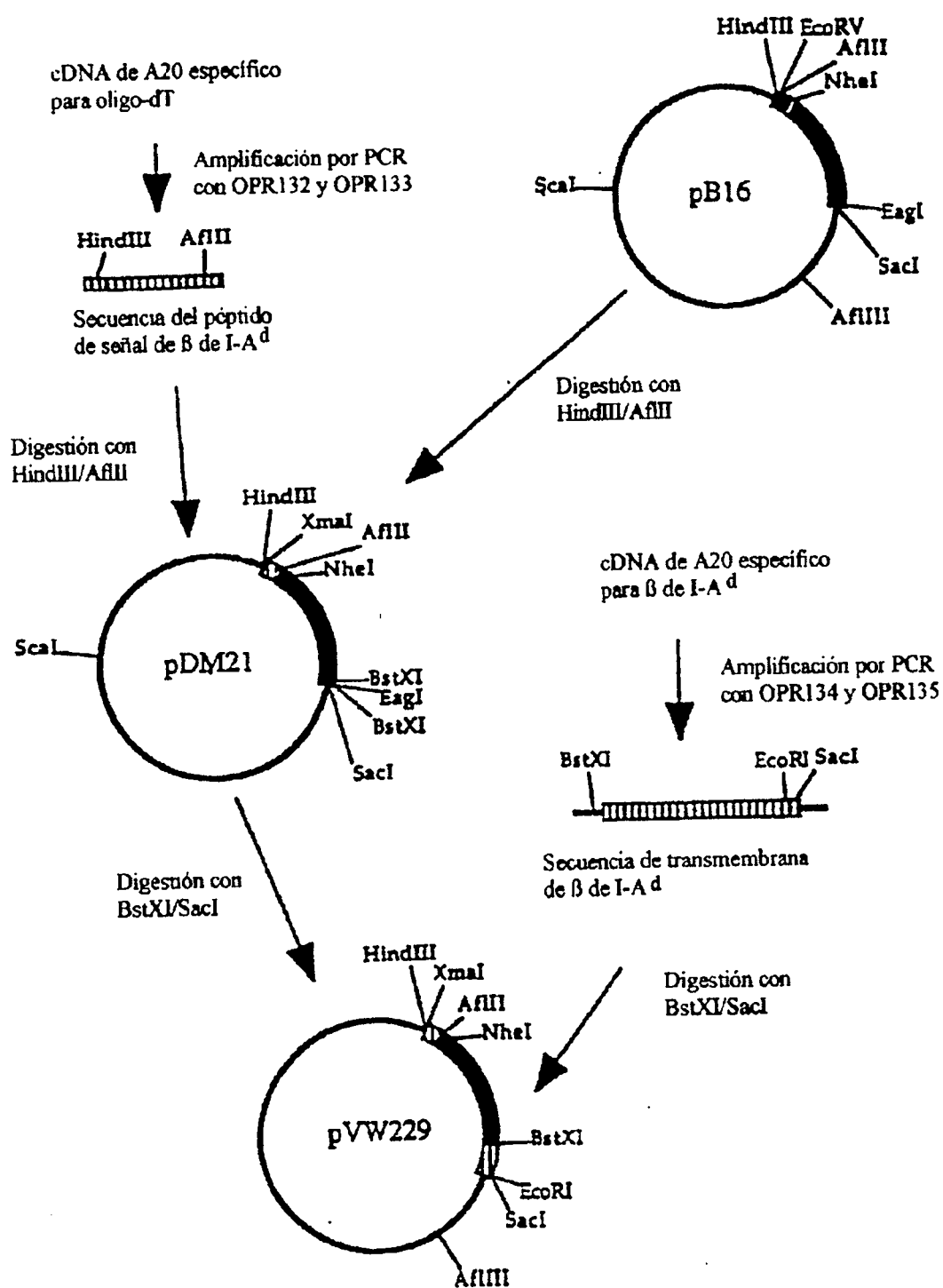


Figura 19 (Hoja 4 de 7)

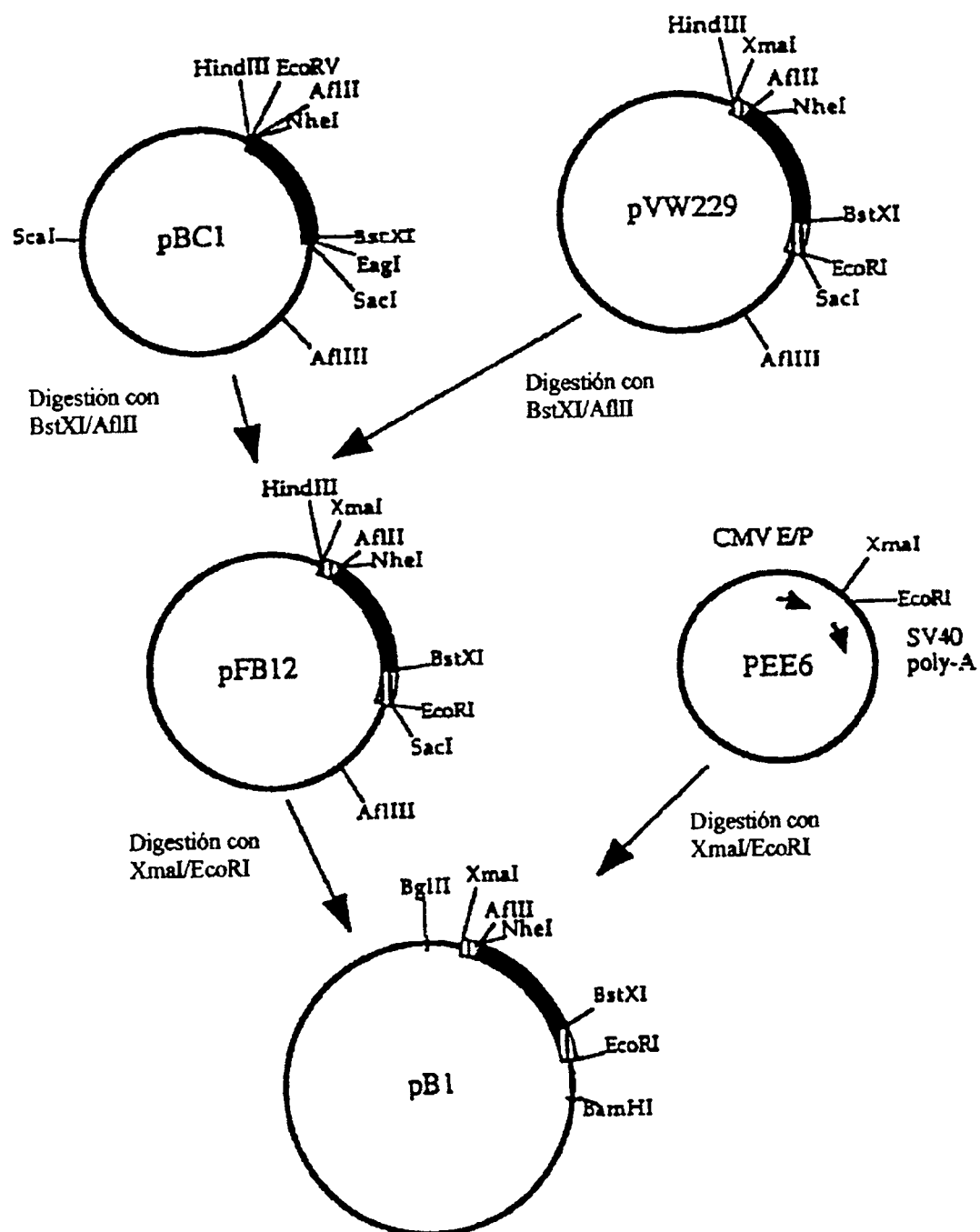


Figura 19 (Hoja 5 de 7)

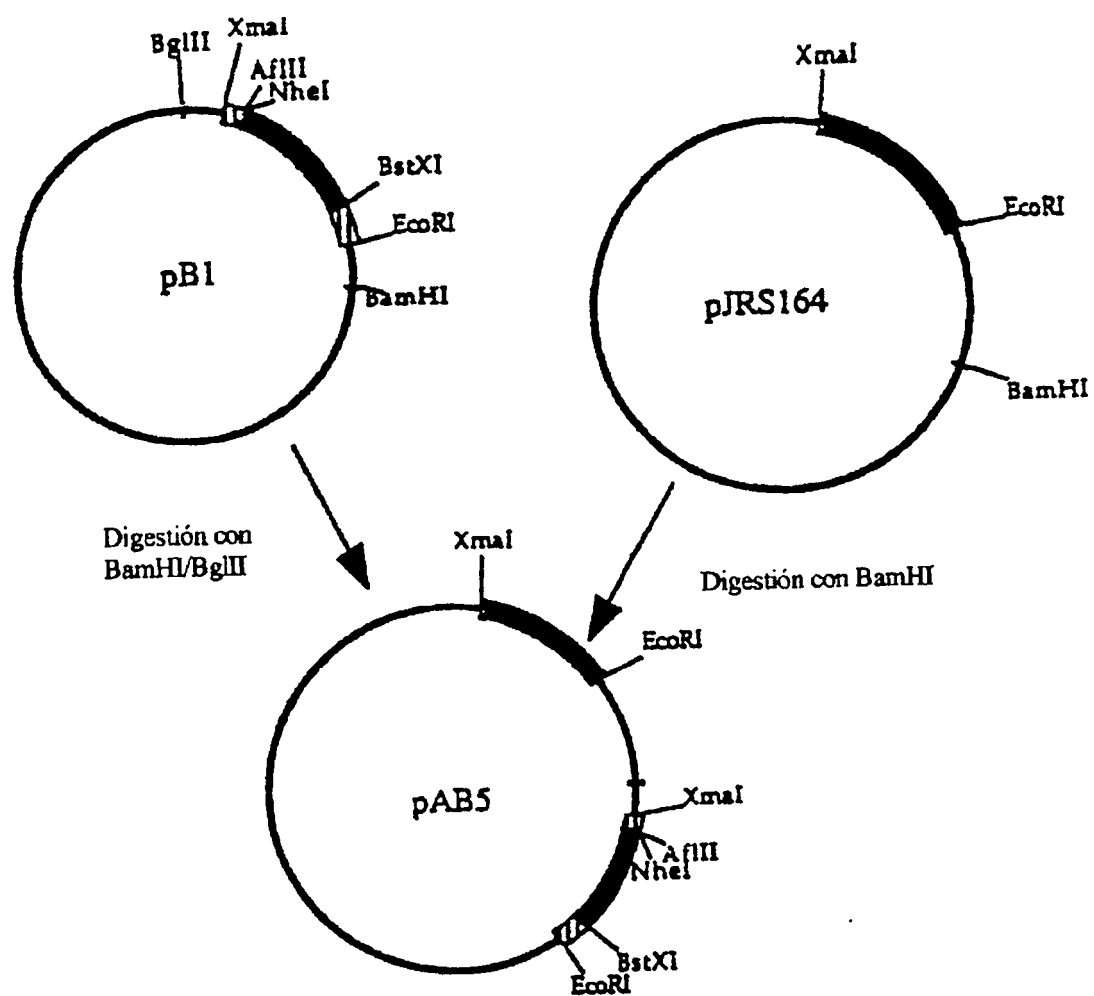


Figura 19 (Hoja 6 de 7)

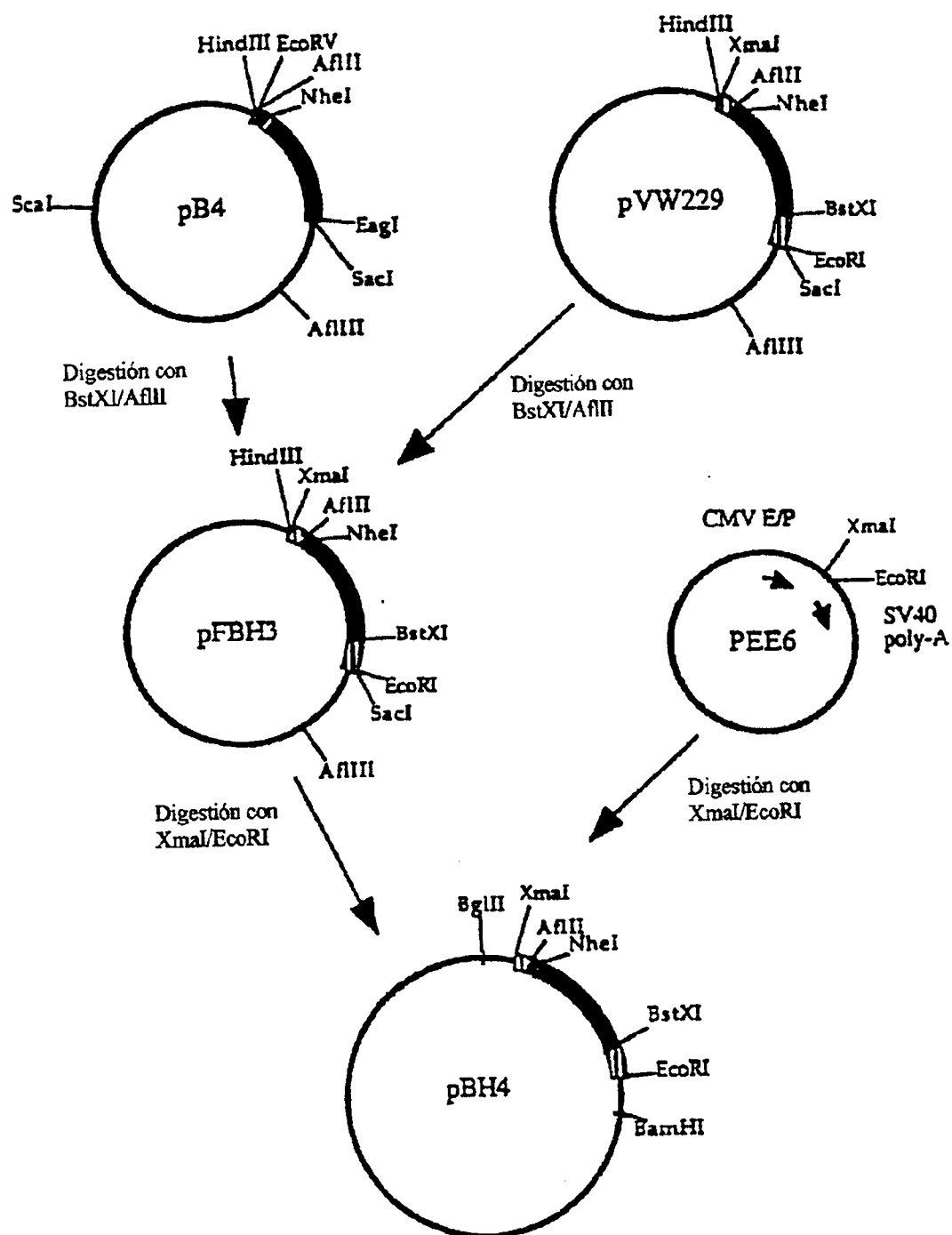
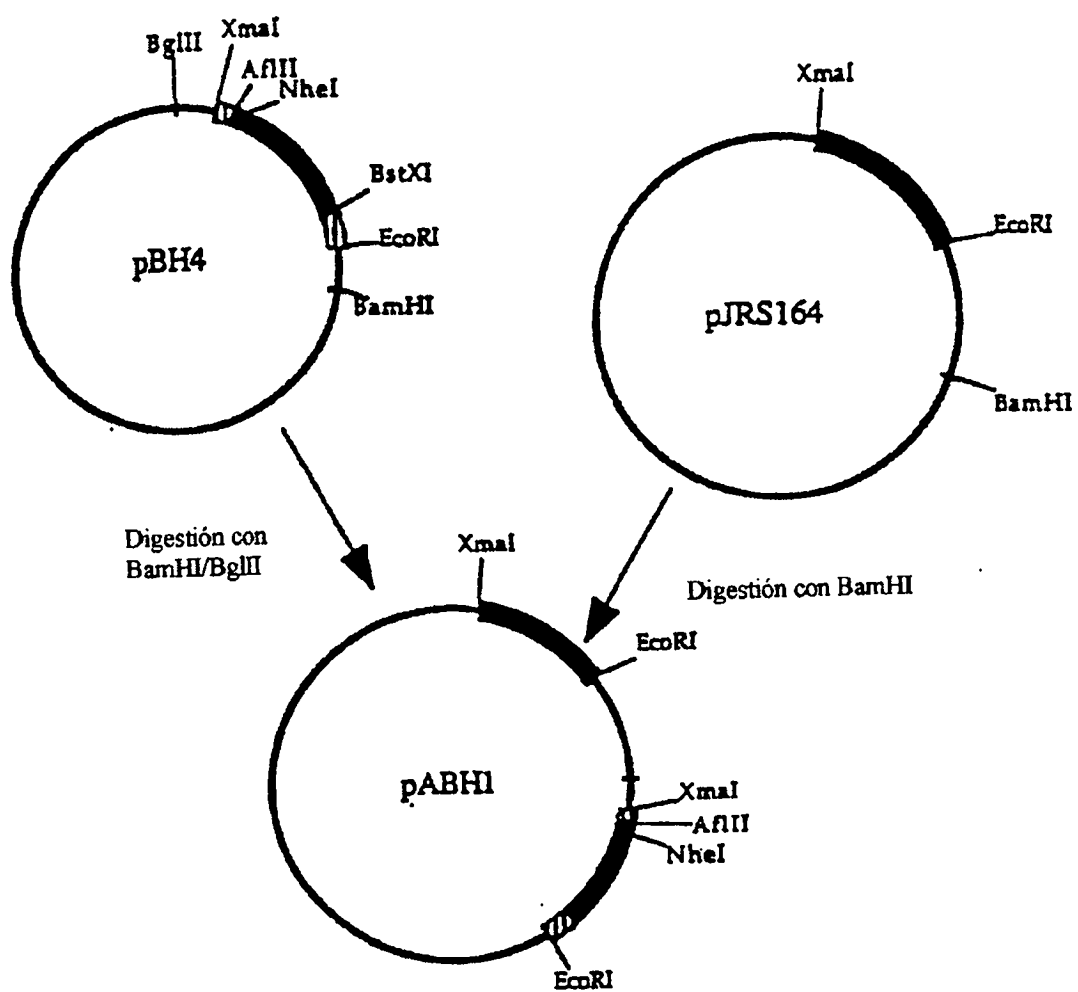


Figura 19 (Hoja 7 de 7)



## Figura 20

Oligonucleótidos usados en la clonación

### OPR132

Cebador frontal del péptido de señal de  $\beta$  de I-A<sup>d</sup> con consenso de Kozak para sitios HindIII/XmaI del vector CellTech

5'-CCC CCC AAG CTT CCC GGG CCA CCA TGG CTC TGC AGA TCC CCA  
GC-3'

### OPR133

Cebador trasero del péptido de señal de  $\beta$  de I-A<sup>d</sup> con consenso de Kozak para el sitio AflII del vector CellTech

5'-CCC CCC ACT TAA GGT CCT TGG GCT GCT CAG CAC C-3'

### OPR134

Cebador frontal de transmembrana de  $\beta$  de I-A<sup>d</sup> para los sitios BstXI del vector CellTech

5'-CCC CCC CCA TCA CTG TGG AGT GGA GGG-3'

### OPR135

Cebador trasero de transmembrana de  $\beta$  de I-A<sup>d</sup> para los sitios SstI, EcoRI del vector CellTech

5'-CCC CCC GAG CTC GAA TCC TCA CTG CAG GAG CCC TGC TGG-3'

### OPR136

Cebador frontal del péptido de señal de  $\alpha$  de I-A<sup>d</sup> con consenso de Kozak para sitios HindIII/XmaI del vector CellTech

5'-CCC CCC AAG CTT CCC GGG CCA CCA TGC CGT GCA GCA GAG CTC  
TG-3'

### OPR139

Cebador frontal de transmembrana de  $\alpha$  de I-A<sup>d</sup> para los sitios SstI/EcoRI del vector CloneTech

5'-CCC CCC GAG CTC GAA TCC TCA TAA AGG CCC TGG GTG TCT G-3'

### B7-1-2F

Cebador frontal B7-1 de murido con consenso de Kozak para el sitio NotI del vector CloneTech

5'-CCC CCC CCG CGG CCG CCC CAC CAT GGG ACT GAG TAA CAT TCT  
C-3'

### B7-1-2B

Cebador trasero B7-1 de murido con consenso de Kozak para el sitio NotI del vector CloneTech

5'-CCC CCC GCG GCC GCT TTA AAA ACA TGT ATC ACT TTT-3'

FIGURA 21

Los clones NSO/Clase II/OVA estimulan la producción de IL-2 a partir de DO11.10

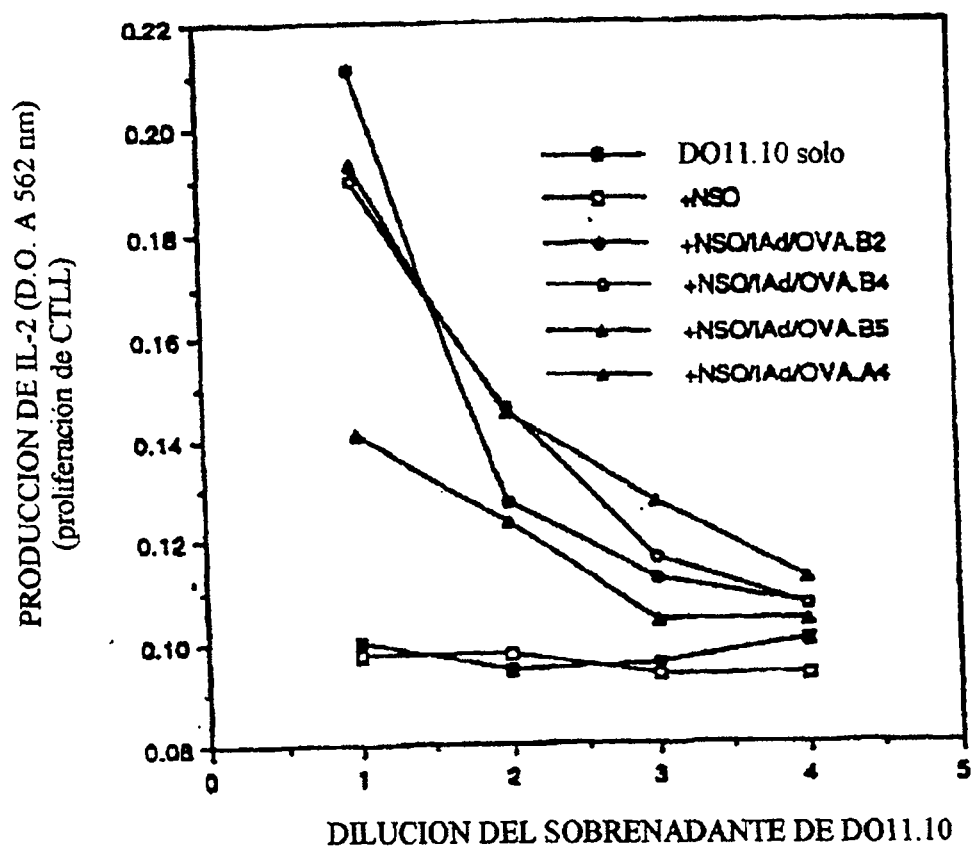


FIGURA 22

INYECCIONES INTRAMUSCULARES DE DNA DE IAd/OVA  
Y B7 ENSAYO DE PROLIFERACION

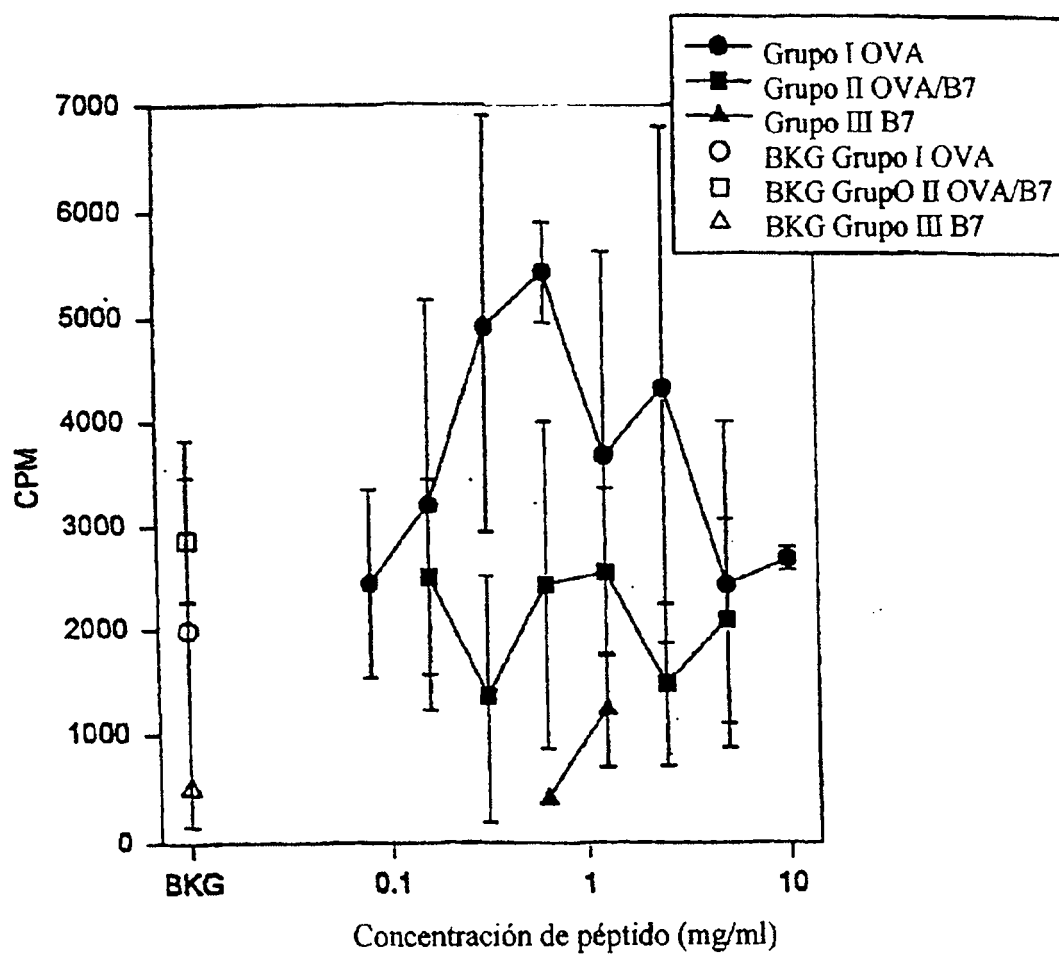


FIGURA 23

INYECCIONES INTRADERMICAS DE DNA DE IAd/OVA Y IAd/HEL  
 ENSAYO DE PROLIFERACION  
 4, 7 Y 14 DIAS DESPUES DE LA INYECCION

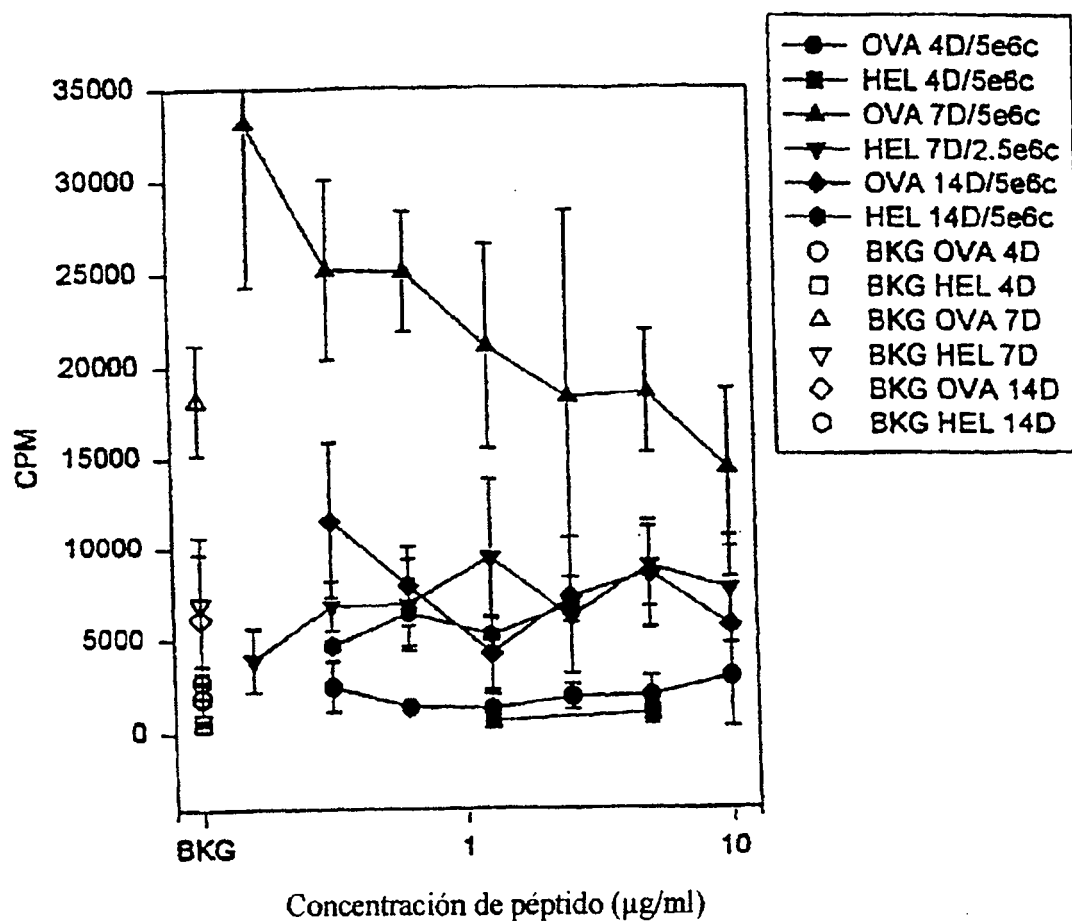


FIGURA 24

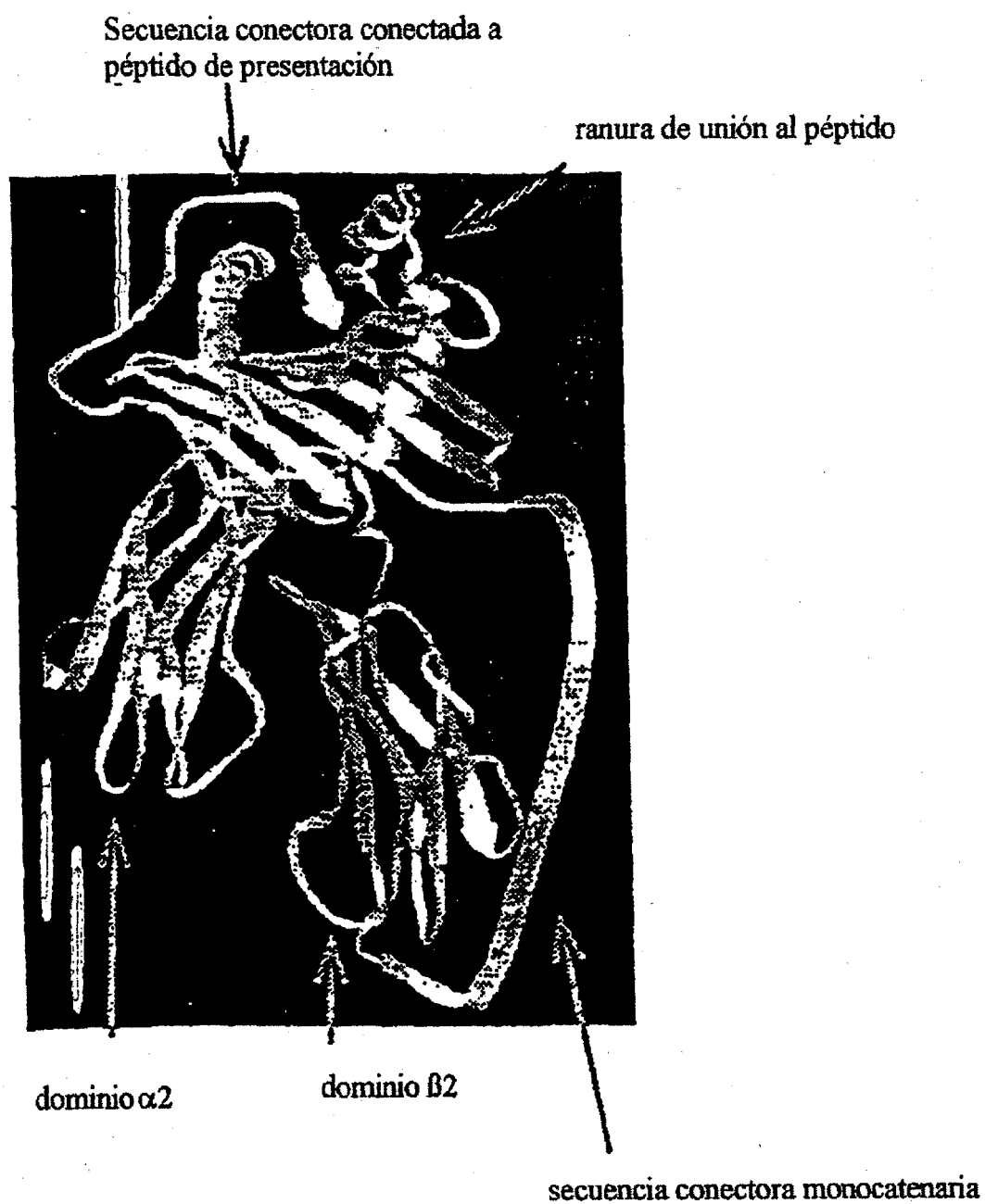


FIGURA 25 (HOJA 1 DE 4)

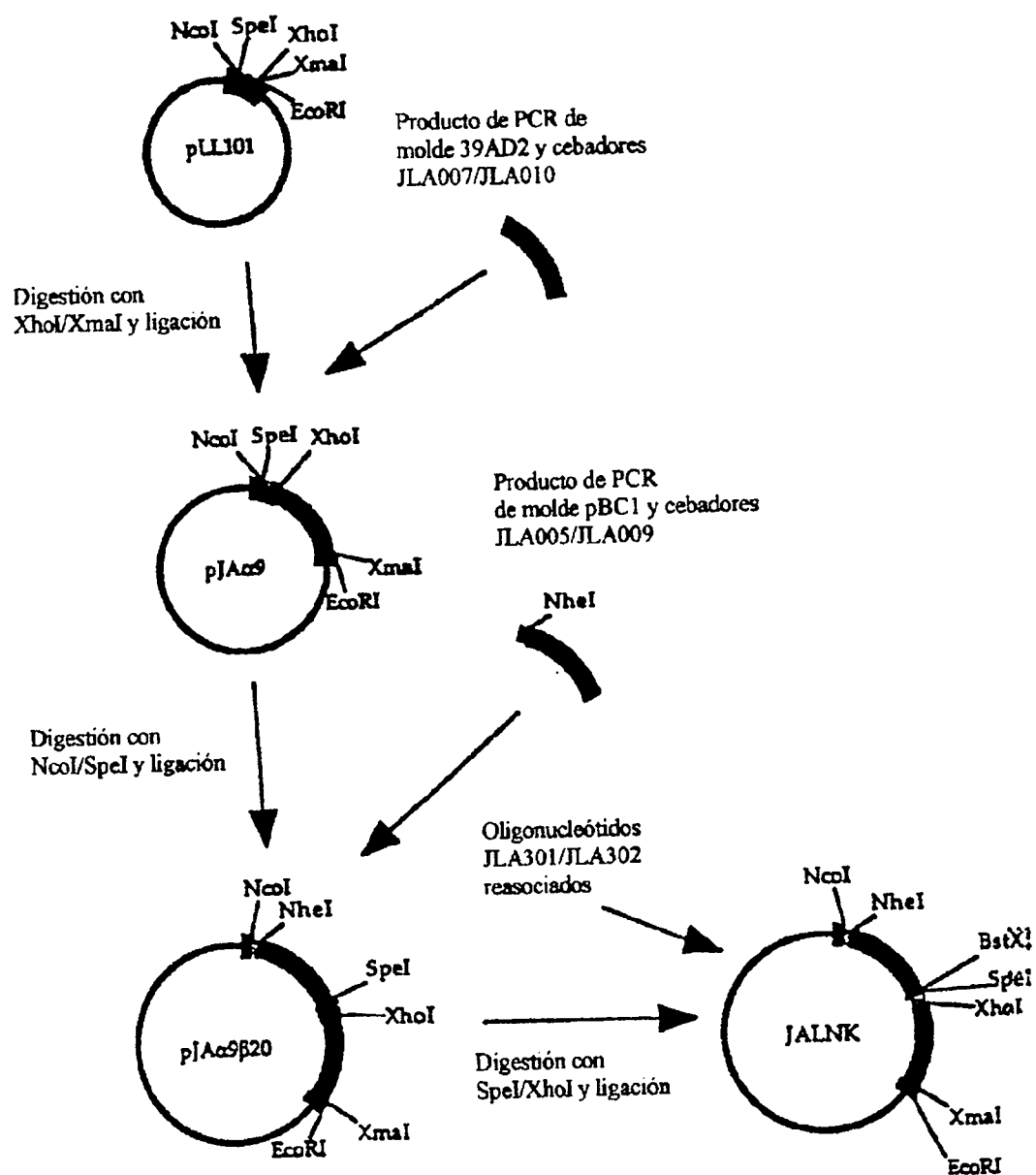


FIGURA 25 (HOJA 2 DE 4)

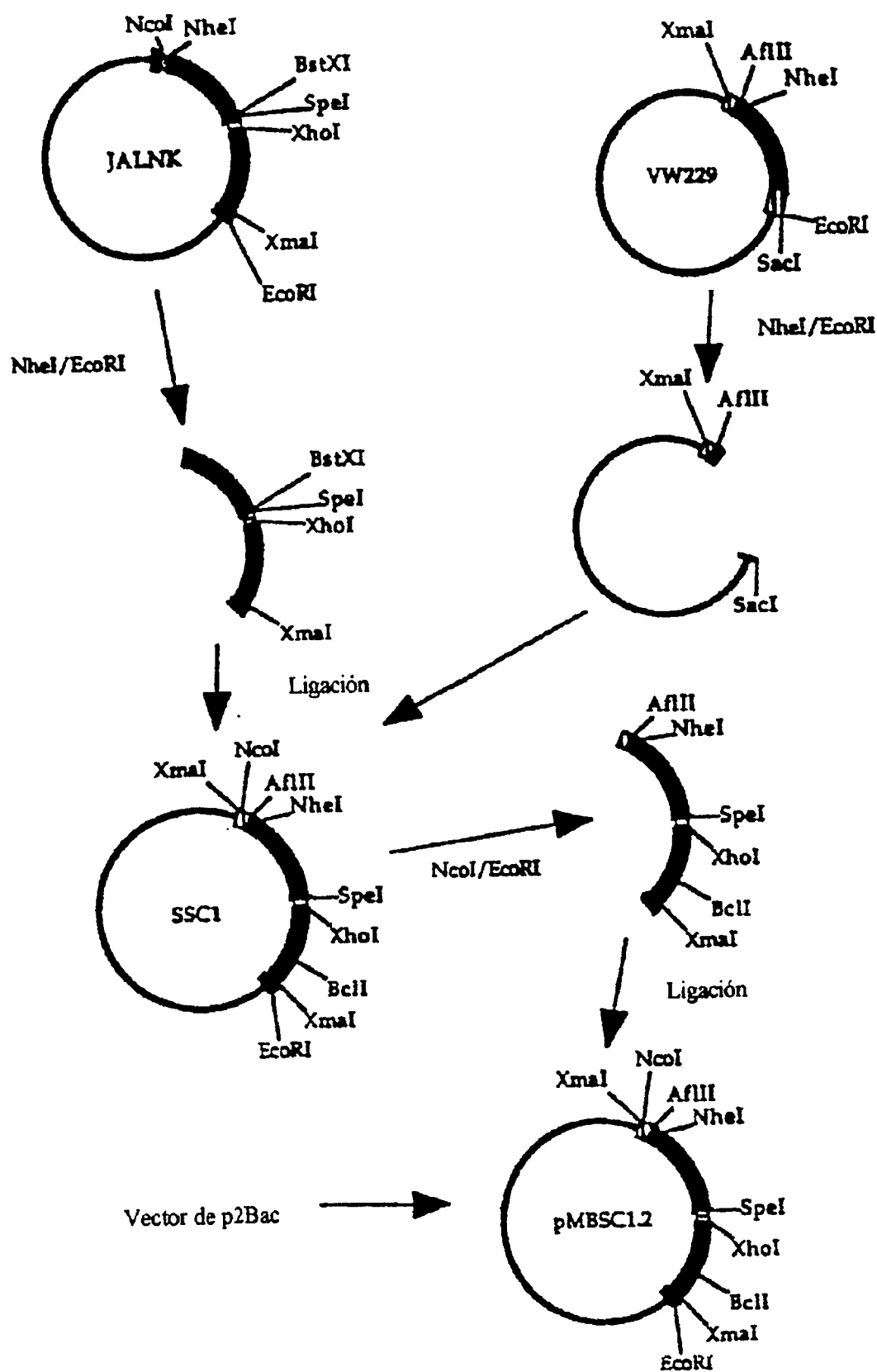


FIGURA 25 (HOJA 3 DE 4)

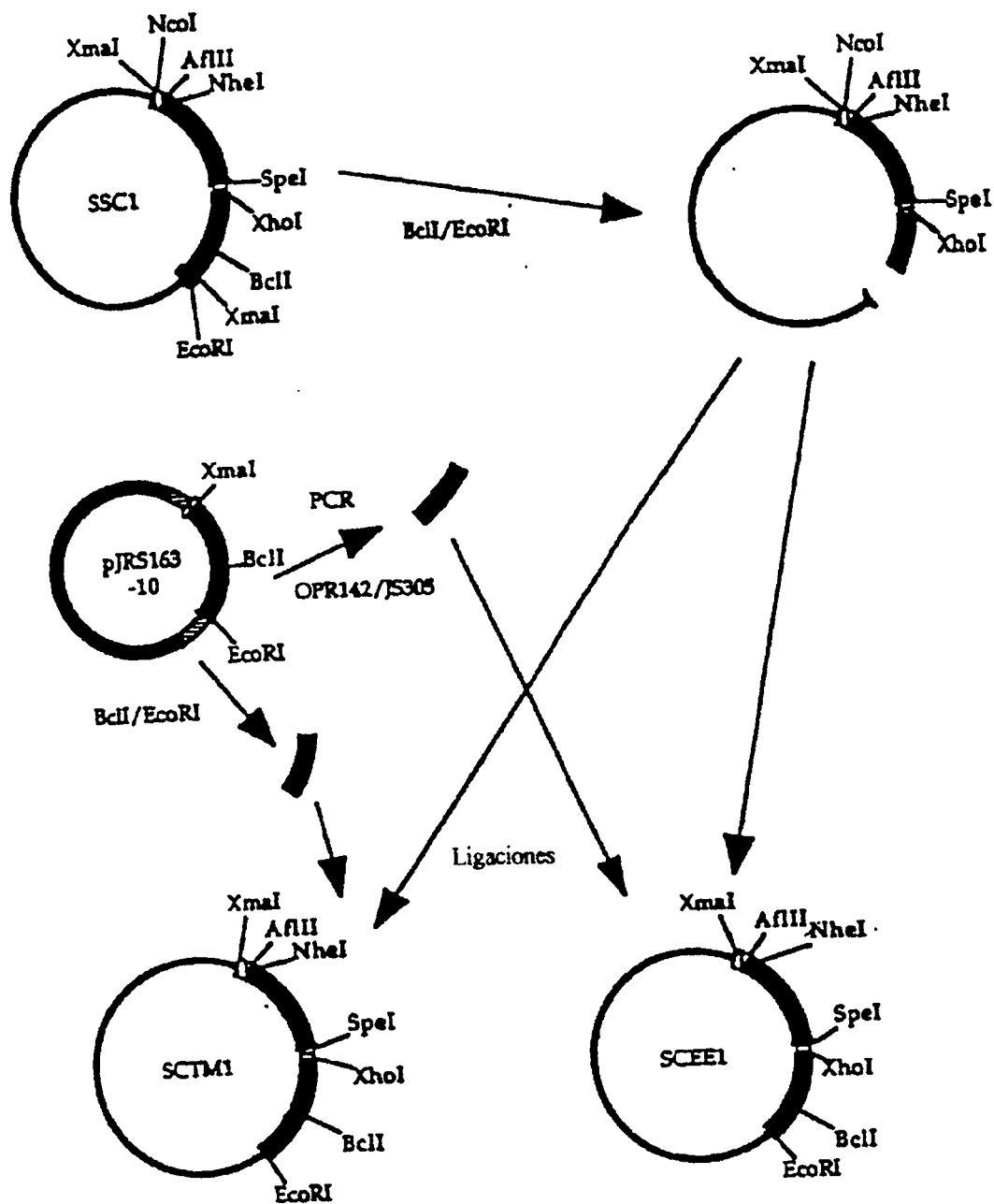


FIGURA 25 (HOJA 4 DE 4)

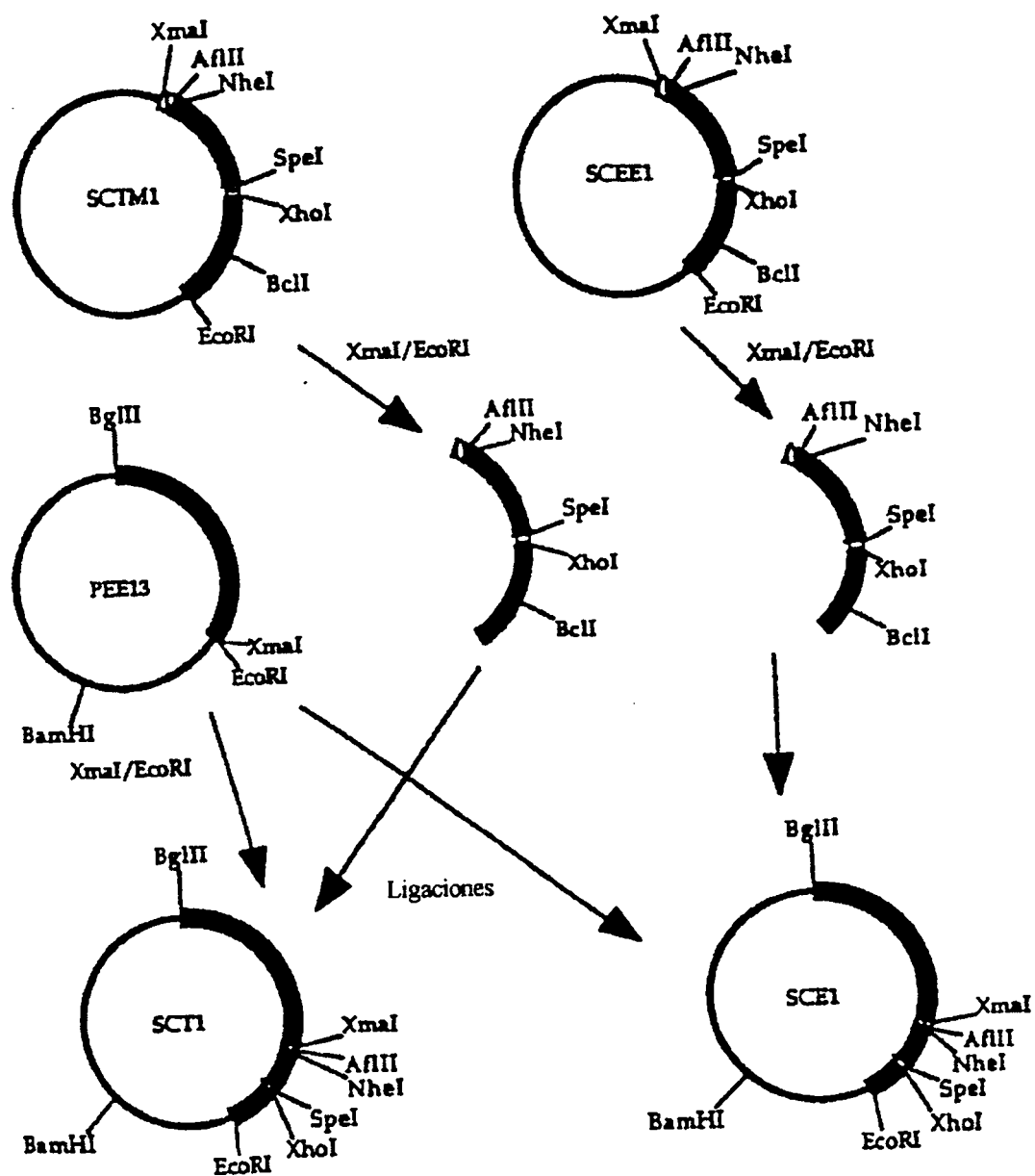


FIGURA 26

JLA-005

5'-CCCCCCGCCATGGCCGCTAGCGGAGGGGGCGGAAGC-3'

JLA-007

5'-CCCGGGGCCTCGAGTGAAGACGACATTGAGGCCGAC-3'

JLA-009

5'-CCCCCCTAGTCCACTCCACAGTGATGGGGCT-3'

JLA-010

5'-CCCCCCCCCGGGACCAGTGTTTCAGAACCGGCTCCTC-3'

JLA-301

5'-TCGAGGAACCGCCACCGCCAGAACCGCCGCCACCGGA-  
ACCACCACCGCCGCTGCCACCGCCACCA-3'

JLA-302

5'-CTAGTGGTGGCGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGTTCCGG-  
TGGCGGCGGTCTGGCGGTGGCGGTTC-3'

OPR-142

5'-CTTGGGAATCTTGACTAAGAGG-3'

JS-305

5'-CAGGTCGAATTCTCATTCATCGGCATGTACTCTTCTT-  
CCTCCCAGTGTTTCAGAACCGG-3'

FIGURA 27 (HOJA 1 DE 4)

```

      10      20      30      40      50
      *      *      *      *      *
CCACC ATG GCT CTG CAG ATC CCC AGC CTC CTC CTC TCA GCT GCT GTG GTG
GGTGG TAC CGA GAC GTC TAG GGG TCG CAG GAG GAG AGT CGA CGA CAC CAC
      M  A  L  Q  I  P  S  L  L  L  S  A  A  V  V>
      <----- líder de la cadena B de I-Ad ----->

      60      70      80      90
      *      *      *      *
GTG CTG ATG GTG CTG AGC AGC CCA AGG ACC TTA AGT ATC TCT CAG GCT
CAC GAC TAC CAC GAC TCG TCG GGT TCC TCG AAT TCA TAG AGA GTC CGA
V  L  M  V  L  S  S  P  R  T  L  S  I  S  Q  A>
----->-----<----->

100      110      120      130      140
      *      *      *      *      *
GTT CAC GCT GCT CAC GCT GAA ATC AAC GAA GCT GGT CGT GCT AGC GGA
CAA GTG CGA CGA GTG CGA CTT TAG TTG CTT CGA CCA GCA CGA TCG CCT
V  H  A  A  H  A  E  I  N  E  A  G  R  A  S  G>
----- OVA 323-339 ----->-----<----->

150      160      170      180      190
      *      *      *      *      *
GGG GGC GGA AGC GGC GGA CCG GGA AAC TCC GAA ACG CAT TTC GTG GTC
CCC CCG CCT TCG CCG CCT CCC CCT TTG AGG CTT TCC GTA AAG CAC CAG
G  G  G  S  G  G  G  G  N  S  E  R  E  F  V  V>
-- conector de 10 aminoácidos -->----- dominio B-1 de I-Ad ----->

200      210      220      230      240
      *      *      *      *      *
CAG TTC AAG GGC GAG TGC TAC TAC ACC AAC GGG ACG CAG CGC ATA CGG
GTC AAG TTC CCG CTC ACG ATG ATG TGG TTG CCC TGC GTC GCG TAT GCC
Q  F  K  G  E  C  Y  Y  T  N  G  T  Q  R  I  R>
----->-----<----->

250      260      270      280      290
      *      *      *      *      *
CTC GTG ACC AGA TAC ATC TAC AAC CCG GAG GAG TAC GTG CGC TAC GAC
GAG CAC TCG TCT ATG TAG ATG TTG GCC CTC CTC ATG CAC GCG ATG CTG
L  V  T  R  Y  I  Y  N  R  E  E  Y  V  R  Y  D>
----->-----<----->

300      310      320      330
      *      *      *      *
AGC GAC GTG GGC GAG TAC CCG GCG CTG ACC GAG CTG GGG CCG CCA GAC
TCG CTG CAC CCG CTC ATG GCG CCG CAC TGG CTC GAC CCC GCC GGT CTG
S  D  V  G  E  Y  R  A  V  T  E  L  G  R  P  D>
----->-----<----->

340      350      360      370      380
      *      *      *      *      *
GCC GAG TAC TGG AAC AGC CAG CCG GAG ATC CTG GAG CGA ACG CCG GCC
CCG CTC ATG ACC TTG TCG GTC GGC CTC TAG GAC CTC GCT TGC GCC CCG
A  E  Y  W  N  S  Q  P  E  I  L  E  R  T  R  A>
----->-----<----->

```

FIGURA 27 (HOJA 2 DE 4)

```

390      400      410      420      430
  *      *      *      *      *
GAG GTG GAC ACG GCG TGC AGA CAC AAC TAC GAG GGG CCG GAG ACC AGC
CTC CAC CTG TGC CCG ACG TCT GTG TTG ATG CTC CCC GGC CTC TGG TCG
E V D T A C R H N Y E G P E T S>
-----

440      450      460      470      480
  *      *      *      *      *
ACC TCC CTG CCG CCG CTT GAA CAG CCC AAT GTC GCC ATC TCC CTG TCC
TGG AGG GAC GCC GCC GAA CTT GTC GGG TTA CAG CCG TAG AGG GAC AGG
T S L R R L E Q P N V A I S L S>
--- dominio B-1 de I-Ad -->----- dominio B-2 de I-Ad -----

490      500      510      520      530
  *      *      *      *      *
AGG ACA GAG GCC CTC AAC CAC CAC AAC ACT CTG GTC TGT TCG GTG ACA
TCC TGT CTC CCG GAG TTG GTG GTG TTG TGA GAC CAG ACA AGC CAC TGT
R T E A L N H H N T L V C S V T>
-----

540      550      560      570
  *      *      *      *
GAT TTC TAC CCA GCC AAG ATC AAA GTG CCG TGG TTC AGG AAT GGC CAG
CTA AAG ATG GGT CCG TTC TAG TTT CAC GCG ACC AAG TCC TTA CCG GTC
D F Y P A K I K V R W F R N G Q>
-----

580      590      600      610      620
  *      *      *      *      *
GAG GAG ACA GTG GGG GTC TCA TCC ACA CAG CTT ATT AGG AAT GGG GAC
CTC CTC TGT CAC CCC CAG AGT AGG TGT GTC GAA TAA TCC TTA CCC CTG
E E T V G V S S T Q L I R N G D>
-----

630      640      650      660      670
  *      *      *      *      *
TGG ACC TTC CAG GTC CTG GTC ATG CTG GAG ATG ACC CCT CAT CAG GGA
ACC TGG AAG GTC CAG GAC CAG TAC GAC CTC TAC TGG GGA GTA GTC CCT
W T F Q V L V M L E H T P H Q Q>
-----

680      690      700      710      720
  *      *      *      *      *
GAG GTC TAC ACC TGC CAT GTC GAG CAT CCC AGC CTG AAG AGC CCC ATC
CTC CAG ATG TGG ACG GTA CAC CTC GTA GGG TCG GAC TTC TCG GGG TAG
E V Y T C H V E H P S L K S P I>
----- dominio B-2 de I-Ad -----

730      740      750      760      770
  *      *      *      *      *
ACT GTG GAG TGG ACT AGT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGT TCC
TGA CAC CTC ACC TGA TCA CCA CCG CCA CCG TCG CCG CCA CCA AGG
T V E W T S G G G G S G G G S>
----->----- conector de 24 aminoácidos -----

```

FIGURA 27 (HOJA 3 DE 4)

```

      780      790      800      810
      *      *      *      *
GGT GGC GGC GGT TCT GGC GGT GGC GGT TCC TCG AGT GAA GAC GAC ATT
CCA CCG CCG CCA AGA CCG CCA CCG CCA ACG AGC TCA CTT CTG CTG TAA
G  G  G  G  S  G  G  G  G  S  S  S  E  D  D  I>
----->-----<-----

820      830      840      850      860
      *      *      *      *      *
GAG GGC GAC CAC GTA GGC TTC TAT GGT ACA ACT GTT TAT CAG TCT CCT
CTC CCG CTG GTG CAT CCG AAG ATA CCA TGT TGA CAA ATA GTC AGA GGA
E  A  D  H  V  G  F  Y  G  T  T  V  Y  Q  S  P>
-----
----- dominio α-1 de I-Ad -----

870      880      890      900      910
      *      *      *      *      *
GCA GAC ATT GGC CAG TAC ACA CAT GAA TTT GAT GGT GAT GAG TTG TTC
CCT CTG TAA CCG GTC ATG TGT GTA CTT AAA CTA CCA CTA CTC AAC AAG
G  D  I  G  Q  Y  T  H  E  F  D  G  D  E  L  F>
-----

920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *
TAT GTG GAC TTG GAT AAG AAG AAA ACT GTC TGG AGG CTT CCT GAG TTT
ATA CAC CTG AAC CTA TTC TTC TTT TGA CAG ACC TCC GAA GGA CTC AAA
Y  V  D  L  D  K  K  K  T  V  W  R  L  P  E  F>
-----

970      980      990      1000      1010
      *      *      *      *      *
GGC CAA TTG ATA CTC TTT CAG CCC CAA GGT GGA CTG CAA AAC ATA GCT
CCG GTT AAC TAT GAG AAA CTC GGG GTT CCA CCT GAC GTT TTG TAT CGA
G  Q  L  I  L  F  E  P  Q  G  G  L  Q  N  I  A>
-----

1020      1030      1040      1050
      *      *      *      *
GCA GAA AAA CAC AAC TTG GGA ATC TTG ACT AAG AGG TCA AAT TTC ACC
CGT CTT TTT GTG TTG AAC CCT TAG AAC TGA TTC TCC AGT TTA AAG TGG
A  E  K  H  N  L  G  I  L  T  K  R  S  N  F  T>
-----
----- dominio α-1 de I-Ad -----

1060      1070      1080      1090      1100
      *      *      *      *      *
CCA GCT ACC AAT GAG GCT CCT CAA GCG ACT GTG TTC CCC AAG TCC CCT
GGT CGA TGG TTA CTC CGA GGA GTT CGC TGA CAC AAG GGG TTC AGG GGA
P  A  T  N  E  A  P  Q  A  T  V  F  P  K  S  P>
----->-----<----- dominio α-2 de I-Ad -----

1110      1120      1130      1140      1150
      *      *      *      *      *
GTG CTG CTG GGT CAG CCC AAC ACC CTT ATC TGC TTT GTG GAC AAC ATC
CAC GAC GAC CCA GTC GGG TTG TGG GAA TAG ACG AAA CAC CTG TTG TAG
V  L  L  G  Q  P  N  T  L  I  C  F  V  D  N  I>
-----

```

FIGURA 27 (HOJA 4 DE 4)

|                                                                 |      |      |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|------|------|
| 1160                                                            | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 |
| TTC CCA OCT GTG ATC AAC ATC ACA TCG CTC AGA AAT AGC AAG TCA GTC |      |      |      |      |
| AAG GGT GGA CAC TAG TTG TAG TGT ACC GAG TCT TTA TCG TTC AGT CAG |      |      |      |      |
| P P D V I N I T W L R H S K S V>                                |      |      |      |      |
| 1210                                                            | 1220 | 1230 | 1240 | 1250 |
| ACA GAC GGC GTT TAT GAG ACC AGC TTC CTC GTC AAC GGT GAC CAT TCG |      |      |      |      |
| TGT CTC GCG CAA ATA CTC TGG TGG AAG GAG CAG TTG CCA CTG GTA AGG |      |      |      |      |
| T D G V Y E T S F L V N R D H S>                                |      |      |      |      |
| 1260                                                            | 1270 | 1280 | 1290 |      |
| TTC CAC AAG CTG TCT TAT CTC ACC TTC ATC CCT TCT GAT GAT GAC ATT |      |      |      |      |
| AAG GTG TTC GAC AGA ATA GAG TGG AAG TAG GGA AGA CTA CTA CTG TAA |      |      |      |      |
| F H K L S Y L T F I P S D D D I>                                |      |      |      |      |
| 1300                                                            | 1310 | 1320 | 1330 | 1340 |
| TAT GAC TGC AAG GTG GAG CAC TGG GGC CTG GAG GAG CCG GGT CTG AAA |      |      |      |      |
| ATA CTG ACG TTC CAC CTC GTG ACC CCG GAC CTC CTC GCG CAA GAC TTT |      |      |      |      |
| Y D C K V R H W G L E E P V L K>                                |      |      |      |      |
| dominio $\alpha$ -2 de L-Ad                                     |      |      |      |      |
| 1350                                                            | 1360 | 1370 | 1380 |      |
| CAC TGG TCG CCG GCT AGT CAC CAT CAC CAT CAT CAC TAG             |      |      |      |      |
| GTG ACC AGG GCG CCA TCA GTG GTA GTG GGA GTA GTG ATC             |      |      |      |      |
| H W S R A S H H H H H R >                                       |      |      |      |      |
| diagnóstico 6 X HIS                                             |      |      |      |      |

FIGURA 28 (HOJA 1 DE 4)

```

      10      20      30      40      50
      *      *      *      *      *
CCACC ATG GCT CTG CAG ATC CCC AGC CTC CTC CTC TCA GCT GCT GTG GTG
GGTGG TAC CGA GAC GTC TAG GGG TCG GAG GAG GAG AGT CGA CGA CAC CAC
      M  A  L  Q  I  P  S  L  L  L  S  A  A  V  V>
      <----- líder de la cadena β de I-Ad ----->

      60      70      80      90
      *      *      *      *
GTG CTG ATG GTG CTG AGC AGC CCA AGG ACC TTA AGT ATC TCT CAG GCT
CAC GAC TAC CAC GAC TCG TCG GGT TCC TCG AAT TCA TAG AGA GTC CGA
      V  L  M  V  L  S  S  P  R  T  L  S  I  S  Q  A>
      ----->-----<----->

100      110      120      130      140
      *      *      *      *      *
GTT CAC GCT GCT CAC GCT GAA ATC AAC GAA GCT GGT CGT GCT AGC CGA
CAA GTG CGA CGA GTC CGA CTT TAG TTG CTT CGA CCA GCA CGA TCG CCT
      V  H  A  A  H  A  E  I  N  E  A  G  R  A  S  G>
      ----- OVA 323-339 ----->-----<----->

      150      160      170      180      190
      *      *      *      *      *
GGG GGC CGA ACC GGC GGA GGG GGA AAC TCC GAA AGG CAT TTC GTG GTC
CCC CCG CCT TCG CCG CCT CCC CCT TTG AGG CTT TCC GTA AAG CAC CAG
      G  G  G  S  G  G  G  G  N  S  E  R  H  F  V  V>
      -- conector de 10 aminoácidos -->----- dominio β-I de I-Ad ----->

      200      210      220      230      240
      *      *      *      *      *
CAG ATC AAG GGC GAG TGC TAC TAC ACC AAC GGG ACG CAG CGC ATA CGG
GTC AAG TTC CCG CTC ACG ATG ATG TGG TTG CCC TCC GTC CGC TAT GCC
      Q  F  K  G  E  C  Y  Y  T  N  G  T  Q  R  I  R>
      ----->-----<----->

      250      260      270      280      290
      *      *      *      *      *
CTC GTG ACC AGA TAC ATC TAC AAC CCG GAG GAG TAC GTG CGC TAC GAC
GAG CAC TGG TCT ATG TAG ATG TTG GCC CTC CTC ATG CAC GCG ATG CTG
      L  V  T  R  Y  I  Y  N  R  E  E  Y  V  R  Y  D>
      ----->-----<----->

      300      310      320      330
      *      *      *      *
AGC GAC GTG GGC GAG TAC CCG CCG CTG ACC GAG CTG GGG CCG CCA GAC
TCG CTG CAC CCG CTC ATG GCG CCG CAC TGG CTC GAC CCC GCC GGT CTG
      S  D  V  G  E  Y  R  A  V  T  E  L  G  R  P  D>
      ----->-----<----->

      340      350      360      370      380
      *      *      *      *      *
GCC CAG TAC TGG AAC AGC CAG CCG GAG ATC CTC GAG CGA ACG CCG GCC
CGG CTC ATG ACC TTG TCG GTC GCG CTC TAG GAC CTC GGT TCG GCC CCG
      A  E  Y  H  H  S  Q  P  E  I  L  E  R  T  R  A>
      ----->-----<----->

```

FIGURA 28 (HOJA 2 DE 4)

```

390      400      410      420      430
*      *      *      *      *
GAG GTG GAC ACG GCG TGC AGA CAC AAC TAC GAG GCG CCG GAG ACC AGC
CTC CAC CTG TGC CCG ACG TCT GTG TTG ATG CTC CCC GGC CTC TGG TCG
E V D T A C R H N Y E G P E T S>
-----

440      450      460      470      480
*      *      *      *      *
ACC TCC CTG CCG CCG CTT GAA CAG CCC AAT GTC GCC ATC TCC CTG TCC
TGG AGG GAC GCC GCC GAA CTT GTC GGG TTA CAG CCG TAG AGG GAC AGG
T S L R R L E Q P N V A I S L S>
---- dominio B-1 de I-Ad --><----- dominio B-2 de I-Ad -----

490      500      510      520      530
*      *      *      *      *
AGG ACA GAG GCC CTC AAC CAC CAC AAC ACT CTG GTC TGT TCG GTG ACA
TCC TGT CTC CCG GAG TTG GTG GTG TTG TGA GAC CAG ACA AGC CAC TGT
R T E A L N H H N T L V C S V T>
-----

540      550      560      570
*      *      *      *
GAT TTC TAC CCA GCC AAG ATC AAA CTG CCG TCG TTC AGG AAT GGC CAG
CTA AAG ATG GGT CCG TTC TAG TTT CAC CCG ACC AAG TCC TTA CCG GTC
D F Y P A K I K V R W F R N G Q>
-----

580      590      600      610      620
*      *      *      *      *
GAG GAG ACA GTG GGG GTC TCA TCC ACA CAG CTT ATT AGG AAT GGG GAC
CTC CTC TGT CAC CCC CAG AGT AGG TGT GTC GAA TAA TCC TTA CCC CTG
E E T V G V S S T Q L I R N G D>
-----

630      640      650      660      670
*      *      *      *      *
TGG ACC TTC CAG GTC CTG GTC ATG CTG GAG ATG ACC CCT CAT CAG GGA
ACC TGG AAG GTC CAG GAC CAG TAC GAC CTC TAC TCG CCA GTA GTC CCT
W T F Q V L V M L E H T P H Q G>
-----

680      690      700      710      720
*      *      *      *      *
GAG GTC TAC ACC TGC CAT GTG GAG CAT CCC AGC CTG AAG AGC CCC ATC
CTC CAG ATG TGG ACG GTA CAC CTC GTA GGG TCG GAC TTC TCG GGG TAG
E V Y T C H V E H P S L K S P I>
-----
                                dominio B-2 de I-Ad -----

730      740      750      760      770
*      *      *      *      *
ACT GTG GAG TGG ACT AGT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGT GGT TCC
TGA CAC CTC ACC TGA TCA CCA CCG CCA CCG TCG CCG CCA CCA CCA AGG
T V E W T S G G G G S G G G S>
-----
                                conector de 24 aminoácidos -----

```

FIGURA 28 (HOJA 3 DE 4)

```

      780      790      800      810
      *      *      *      *
GGT GGC GGC GGT TCT GGC GGT GGC GGT TCC TCG AGT GAA GAC GAC ATT
CCA CCG CCG CCA AGA CCG CCA CCG CCA AGG AGC TCA CTT CTG CTG TAA
G  G  G  G  S  G  G  G  G  S  S  S  E  D  D  L>
----->-----

820      830      840      850      860
      *      *      *      *      *
GAG GTC GAC CAC GTA GGC TTC TAT GGT ACA ACT GTT TAT CAG TCT CCT
CTC CCG CTG GTG CAT CCG AAG ATA CCA TGT TGA CAA ATA GTC AGA GGA
E  A  D  H  V  G  F  Y  G  T  T  V  Y  Q  S  P>
-----
dominio  $\alpha$ -1 de I-Ad

870      880      890      900      910
      *      *      *      *      *
GGA GAC ATT GGC CAG TAC ACA CAT GAA TTT GAT GGT GAT GAG TTG TTC
CCT CTG TAA CCG GTC ATG TGT GTA CTT AAA CTA CCA CTA CTC AAC AAG
G  D  I  G  Q  Y  T  H  E  F  D  G  D  E  L  F>
-----

920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *
TAT CTG GAC TTG GAT AAG AAG AAA ACT GTC TCG AGG CTT CCT GAG TTT
ATA CAC CTG AAC CTA TTC TTC TTT TGA CAG ACC TCC GAA GGA CTC AAA
Y  V  D  L  D  K  K  K  T  V  W  R  L  P  E  F>
-----

970      980      990      1000      1010
      *      *      *      *      *
GGC CAA TTG ATA CTC TTT GAG CCC CAA GGT GGA CTG CAA AAC ATA GCT
CCG GTT AAC TAT GAG AAA CTC GGG GTT CCA CCT GAC GTT TTG TAT CGA
G  Q  L  I  L  F  E  P  Q  G  G  L  Q  N  I  A>
-----

1020      1030      1040      1050
      *      *      *      *
GCA GAA AAA CAC AAC TTG GCA ATC TTG ACT AAG AGG TCA AAT TTC ACC
CCT CTT TTT GTG TTG AAC CCT TAG AAC TGA TTC TCC AGT TTA AAG TGG
A  E  K  H  N  L  G  I  L  T  K  R  S  N  P  T>
-----
dominio  $\alpha$ -1 de I-Ad

1060      1070      1080      1090      1100
      *      *      *      *      *
CCA GCT ACC AAT GAG GCT CCT CAA GCG ACT GTG TTC CCC AAG TCC CCT
GGT CGA TGG TTA CTC CGA GGA GTT GCG TGA CAC AAG GGG TTC AGG CGA
P  A  T  N  E  A  P  Q  A  T  V  F  P  K  S  P>
----->-----
dominio  $\alpha$ -2 de I-Ad

1110      1120      1130      1140      1150
      *      *      *      *      *
GTG CTG CTG GGT CAG CCC AAC ACC CTT ATC TGC TTT GTG GAC AAC ATC
CAC GAC GAC CCA GTC GGG TTG TGG GAA TAG ACG AAA CAC CTG TTG TAG
V  L  L  G  Q  P  N  F  L  Y  C  F  V  D  N  I>
-----

```

FIGURA 28 (HOJA 4 DE 4)

```

      1160      1170      1180      1190      1200
      .        .        .        .        .
TTC CCA CCT GTG ATC AAC ATC ACA TGG CTC AGA AAT ACC AAG TCA GTL
AAG CGT GGA CAC TAG TTG TAG TGT ACC GAG TCT TTA TCG TTC AGT CAG
P P P V I N I T W L R N S K S V>
-----

      1210      1220      1230      1240      1250
      .        .        .        .        .
ACA GAC GGC GTT TAT GAG ACC ACC TTC CTC GTC AAC CGT GAC CAT TCC
TGT CTG CCG CAA ATA CTC TGG TCG AAG GAG CAG TTG GCA CTG GTA AGG
T D G V Y E T S F L V N R D E S>
-----

      1260      1270      1280      1290
      .        .        .        .
TTC CAC AAG CTG TCT TAT CTC ACC TTC ATC CCT TCT GAT GAT GAC ATT
AAG GTG TTC GAC AGA ATA GAG TGG AAG TAG GGA AGA CTA CTA CTG TAA
P H K L S Y L T F I P S D D D I>
-----

1300      1310      1320      1330      1340
      .        .        .        .        .
TAT GAC TGC AAG GTG GAG CAC TCG GGC CTG GAG GAG CCG GTT CTG AAA
ATA CTG ACG TTC CAC CTC GTG ACC CCG GAC CTC CTC GGC CAA GAC TTT
Y D C K V E H W G L E E P V L K>
-----
----- dominio  $\alpha$ -2 de I-Ad -----

      1350      1360      1370      1380      1390
      .        .        .        .        .
CAC TGC GAA CCT GAG ATT CCA GCC CCC ATG TCA GAG CTG ACA GAA ACT
GTG ACC CTT GGA CTC TAA GGT CCG GGG TAC AGT CTC GAC TGT CTT TGA
H W E P E I P A P H S E L T E T>
-----
----- dominio  $\alpha$ -TM de I-Ad -----

      1400      1410      1420      1430      1440
      .        .        .        .        .
GTG GTG TGT GCC CTG GGG TTG TCT GTG GGC CTT GTG GGC ATC GTG GTG
CAC CAC ACA CCG GAC CCC AAC AGA CAC CCG GAA CAC CCG TAG CAC CAC
V V C A L G L S V G L V G I V V>
-----

      1450      1460      1470      1480      1490
      .        .        .        .        .
GGC ACC ATC TTC ATC ATT CAA GGC CTG CGA TCA GGT GGC ACC TCC AGA
CCG TGG TAG AAG TAG TAA GTT CCG GAC GCT AGT CCA CCG TGG AGG TCT
G T I F I I Q G L R S G G T S R>
-----

      1500
      .
CAC CCA GGC CCT TTA TGA
GTG GGT CCC GGA AAT ACT
H P G P L ">
-----
----- dominio  $\alpha$ -TM de I-Ad -----

```

FIGURA 29(HOJA 1 DE 4)

```

      10      20      30      40      50
      *      *      *      *      *
CCACC ATG GCT CTG CAG ATC CCC AGC CTC CTC CTC TCA GCT GCT GTG GTG
GGTGG TAC CGA GAC GTC TAG GGG TCG GAG GAG GAG AGT CGA CGA CAC CAC
      M  A  L  Q  I  P  S  L  L  L  S  A  A  V  V>
<----- líder de la cadena β de I-Ad ----->

      60      70      80      90
      *      *      *      *
GTG CTG ATG GTG CTG AGC AGC CCA AGG ACC TTA AGT ATC TCT CAG GCT
CAC GAC TAC CAC GAC TCG TCG GGT TCC TGG AAT TCA TAG AGA GTC CGA
V  L  M  V  L  S  S  P  R  T  L  S  I  S  Q  A>
----->-----

100      110      120      130      140
      *      *      *      *      *
GTT CAC GCT GCT CAC GCT GAA ATC AAC GAA GCT GGT CGT GCT AGC GGA
CAA GTG CGA CGA GTG CGA CTT TAG TTG CTT CGA CCA GCA CGA TCG CCT
V  H  A  A  H  A  E  I  N  E  A  G  R  A  S  G>
----- OVA 323-339 ----->-----

150      160      170      180      190
      *      *      *      *      *
GGG GGC GGA AGC GGC GGA GGG GGA AAC TCC GAA AGG CAT TTC GTG GTC
CCC CCG CCT TCG CCG CCT CCC CCT TTG AGG CTT TCC GTA AAG CAC CAG
G  G  G  S  G  G  G  N  S  E  R  H  F  V  V>
-- conector de 10 aminoácidos -->----- dominio β-1 de I-Ad ----->

200      210      220      230      240
      *      *      *      *      *
CAG TTC AAG GGC GAG TGC TAC TAC ACC AAC GGG ACG CAG CGC ATA CCG
GTC AAG TTC CCG CTC ACC ATG ATG TGG TTG CCC TGC GTC GCG TAT GCC
Q  F  K  G  E  C  Y  Y  T  N  G  T  Q  R  I  R>
----->-----

250      260      270      280      290
      *      *      *      *      *
CTC GTG ACC AGA TAC ATC TAC AAC CCG GAG GAG TAC GTG CCG TAC GAC
GAG CAC TGG TCT ATG TAG ATG TTG GCC CTC CTC ATG CAC GCG ATG CTG
L  V  T  R  Y  I  Y  N  R  E  E  Y  V  R  Y  D>
----->-----

300      310      320      330
      *      *      *      *
AGC GAC GTG GGC GAG TAC CCG GCG CTG ACC GAG CTG GCG CCG CCA GAC
TCG CTG CAC CCG CTC ATG GCG CCG CAC TGG CTC GAC CCC GCC GGT CTG
S  D  V  G  E  Y  R  A  V  T  E  L  G  R  P  D>
----->-----

340      350      360      370      380
      *      *      *      *      *
GCC GAG TAC TGG AAC AGC CAG CCG GAG ATC CTG GAG CGA ACG CCG GCC
CGG CTC ATG ACC TTG TCG GTC GCG CTC TAG GAC CTC GGT TCG GCC CCG
A  E  Y  W  N  S  Q  P  E  I  L  E  R  T  R  A>
----->-----

```

FIGURA 29 (HOJA 2 DE 4)

```

390      400      410      420      430
  *      *      *      *      *
GAG GTG GAC ACG GCG TGC AGA CAC AAC TAC GAG GGG CCG GAG ACC AGC
CTC CAC CTG TGC CGC ACG TCT GTG TTG ATG CTC CCC GGC CTC TCG TCG
E V D T A C R H N Y E G P E T S>
-----

440      450      460      470      480
  *      *      *      *      *
ACC TCC CTG CCG CCG CTT GAA CAG CCC AAT GTC GCC ATC TCC CTG TCC
TGG AGG GAC GCC GCC GAA CTT GTC GGG TTA CAG CCG TAG AGG GAC AGG
T S L R R L E Q P N V A I S L S>
--- dominio B-1 de I-Ad --<----- dominio B-2 de I-Ad -----

490      500      510      520      530
  *      *      *      *      *
AGG ACA GAG GCC CTC AAC CAC CAC AAC ACT CTC GTC TGT TCG GTG ACA
TCC TGT CTC CCG GAG TTG GTG GTG TTG TGA GAC CAG ACA AGC CAC TGT
R T E A L N H H N T L V C S V T>
-----

540      550      560      570
  *      *      *      *
GAT TTC TAC CCA GCC AAG ATC AAA GTG CCG TGG TTC AGG AAT GGC CAG
CTA AAG ATG GGT CCG TTC TAG TTT CAC GCG ACC AAG TCC TTA CCG GTC
D F Y P A K I K V R W F R N G Q>
-----

580      590      600      610      620
  *      *      *      *      *
GAG GAG ACA GTG GGG GTC TCA TCC ACA CAG CTT ATT AGG AAT GGG GAC
CTC CTC TGT CAC CCC CAG AGT AGG TGT GTC GAA TAA TCC TTA CCC CTC
E E T V G V S S T Q L I R N G D>
-----

630      640      650      660      670
  *      *      *      *      *
TGG ACC TTC CAG GTC CTG GTC ATG CTG GAG ATG ACC CCT CAT CAG GGA
ACC TGG AAG GTC CAG GAC CAG TAC GAC CTC TAC TGG GGA GTA GTC CCT
W T F Q V L V H L E M T P H Q G>
-----

680      690      700      710      720
  *      *      *      *      *
GAG GTC TAC ACC TGC CAT GTG GAG CAT CCC AGC CTC AAG AGC CCC ATC
CTC CAG ATG TGG ACG GTA CAC CTC GTA CCG TCG GAC TTC TCG GCG TAG
E V Y T C H V E H P S L K S P I>
-----
                                dominio B-2 de I-Ad -----

730      740      750      760      770
  *      *      *      *      *
ACT GTG GAG TGG ACT AGT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGT GGT TCC
TGA CAC CTC ACC TGA TCA CCA CCG CCA CCG TCG CCG CCA CCA CCA AGC
T V E W T S G G G G S G G G G S>
-----
                                conector de 24 aminoácidos -----

```

FIGURA 29 (HOJA 3 DE 4)

```

      780      790      800      810
      *      *      *      *
GGT GGC GGC GGT TGT GGC GGT GGC GGT TCC TCG AGT GAA GAC GAC ATT
CCA CCG CCG CCA ACA CCG CCA CCG CCA AGG AGC TCA CTT CTG CTG TAA
G  G  G  G  S  G  G  G  G  S  S  S  S  E  D  D  L>
----->-----

820      830      840      850      860
      *      *      *      *      *
GAG GCC GAC CAC GTA GGC TTC TAT GGT ACA ACT GTT TAT CAG TCT CCT
CTC CCG CTG GTG CAT CCG AAG ATA CCA TGT TGA CAA ATA GTC ACA GCA
E  A  D  H  V  G  F  Y  G  T  T  V  Y  Q  S  P>
-----
dominio  $\alpha$ -1 de I-Ad

870      880      890      900      910
      *      *      *      *      *
GGA GAC ATT GGC CAG TAC ACA CAT GAA TTT GAT GGT GAT GAG TTG TTC
CCT CTG TAA CCG GTC ATG TGT GTA CTT AAA CTA CCA CTA CTC AAC AAG
G  D  I  G  Q  Y  T  H  E  F  D  G  D  E  L  P>
-----

920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *
TAT GTG GAC TTG GAT AAG AAG AAA ACT GTC TCG AGG CTT CCT GAG TTT
ATA CAC CTG AAC CTA TTC TTC TTT TGA CAG ACC TCC GAA GGA CTC AAA
Y  V  D  L  D  K  K  K  T  V  W  R  L  P  E  P>
-----

970      980      990      1000      1010
      *      *      *      *      *
GGC CAA TTG ATA CTC TTT GAG CCC CAA GGT GGA CTG CAA AAC ATA GCT
CCG GTT AAC TAT GAG AAA CTC GGC GTT CCA CCT GAC GTT TTG TAT CGA
G  Q  L  I  L  F  E  P  Q  G  G  L  Q  N  I  A>
-----

1020      1030      1040      1050
      *      *      *      *
GCA GAA AAA CAC AAC TTG GGA ATC TTG ACT AAG ACG TCA AAT TTC ACC
CGT CTT TTT GTG TTG AAC CCT TAG AAC TGA TTC TCC AGT TTA AAG TGG
A  E  K  H  N  L  G  I  L  T  K  R  S  N  F  T>
-----
dominio  $\alpha$ -1 de I-Ad

1060      1070      1080      1090      1100
      *      *      *      *      *
CCA GCT ACC AAT GAG GCT CCT CAA GCG ACT GTG TTC CCC AAG TCC CCT
GGT CGA TGG TTA CTC CGA GGA GTT CGC TGA CAC AAG GCG TTC ACG GGA
P  A  T  N  E  A  P  Q  A  T  V  F  P  K  S  P>
----->-----
dominio -2 de I-Ad

1110      1120      1130      1140      1150
      *      *      *      *      *
GTG CTG CTC GGT CAG CCC AAC ACC CTT ATC TCG TTT GTG GAC AAC ATC
CAC GAC CAC CCA GTC GCG TTG TGG CAA TAG ACG AAA CAC CTG TTG TAG
V  L  L  G  Q  P  N  T  L  I  C  F  V  D  N  I>
-----

```

FIGURA 29 (HOJA 4 DE 4)

|                                                                 |      |      |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|------|------|
| 1160                                                            | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 |
| TTC CCA CCT GTG ATC AAC ATC ACA TGG CTC AGA AAT AGC AAG TCA GTC |      |      |      |      |
| AAG CGT GGA CAC TAG TTG TAG TGT ACC GAG TCT TTA TCG TTC AGT CAG |      |      |      |      |
| F P P V I N I T W L R N S K S V>                                |      |      |      |      |
| -----                                                           |      |      |      |      |
| 1210                                                            | 1220 | 1230 | 1240 | 1250 |
| ACA GAC GGC GTT TAT GAG ACC AGC TTC CTC GTC AAC CGT GAC CAT TCC |      |      |      |      |
| TGT CTG CCG CAA ATA CTC TGG TCG AAG GAG CAG TTG GCA CTG GTA AGG |      |      |      |      |
| T D G V Y E T S F L V M R D H S>                                |      |      |      |      |
| -----                                                           |      |      |      |      |
| 1260                                                            | 1270 | 1280 | 1290 |      |
| TTC CAC AAG CTG TCT TAT CTC ACC TTC ATC CCT TCT GAT GAT GAC ATT |      |      |      |      |
| AAG GTG TTC GAC AGA ATA GAG TGG AAG TAG GGA AGA CTA CTA CTG TAA |      |      |      |      |
| F H K L S Y L T F I F S D D D I>                                |      |      |      |      |
| -----                                                           |      |      |      |      |
| 1300                                                            | 1310 | 1320 | 1330 | 1340 |
| TAT GAC TGC AAG GTG GAG CAC TGG GGC CTG GAG GAG CCG GTT CTG AAA |      |      |      |      |
| ATA CTG ACG TTC CAC CTC GTG ACC CCG GAC CTC CTC GGC CAA GAC TTT |      |      |      |      |
| Y D C K V E H W G L E E P V L E>                                |      |      |      |      |
| ----- dominio $\alpha$ -2 de I-Ad -----                         |      |      |      |      |
| 1350                                                            | 1360 | 1370 | 1380 |      |
| CAC TGG GAG GAA GAA GAG TAC ATG CCG ATG GAA TGA                 |      |      |      |      |
| GTG ACC CTC CTT CTT CTC ATG TAC GGC TAC CTT ACT                 |      |      |      |      |
| H W E E E E Y M P M E >                                         |      |      |      |      |
| -----> Etiqueta EE ----->                                       |      |      |      |      |

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: Sunol Molecular Corporation
- (B) CALLE: 2810 North Commerce Parkway
- (C) CIUDAD: Miramar
- (D) ESTADO: Florida
- (E) PAÍS: EE.UU. de A.
- (F) ZIP: 33025

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: COMPLEJOS DE MHC Y USOS DE LOS MISMOS

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 123

(v) FORMA LEIBLE POR COMPUTADORA:

- (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
- (B) COMPUTADORA: PC Compatible con IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOPORTE LÓGICO: PatentIn Release # 1.0, Versión # 1.25

(vi) DATOS DE SOLICITUD ACTUALES:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US95/09816
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 31 de JULIO de 1995
- (C) CLASIFICACIÓN:

(vii) DATOS DE SOLICITUD ANTERIORES:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/382.454
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 01 de FEBRERO de 1995

(vii) DATOS DE SOLICITUD ANTERIORES:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/283.302
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 29 de JULIO de 1994

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

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

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

**Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly**  
**1 5 10**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 8 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido

## ES 2 152 424 T5

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 2:

5 CCACCATG

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 3:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

15 (C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 3:

20 Ser Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala  
1 5 10 15

Gly Arg

25

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 18 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

35 (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 4:

40 Ser Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala Arg Ala Glu Ile Asn Glu Ala  
1 5 10 15

Gly Arg

45

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

50 (A) LONGITUD: 18 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

55 (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 5:

60 Ser Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Tyr Glu Ile Asn Glu Ala  
1 5 10 15

Gly Arg

65 (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

## ES 2 152 424 T5

- (A) LONGITUD: 13 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

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

**Asn Leu Cys Asn Ile Pro Cys Ser Ala Leu Leu Ser Ser**  
**1 5 10**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 11 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

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

**Gln Ile Ser Val Gln Pro Ala Phe Ser Val Gln**  
**1 5 10**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 13 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

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

**Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr**  
**1 5 10**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 13 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

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

**His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser Gln His Gly Arg**  
**1 5 10**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 10:

## ES 2 152 424 T5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 13 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 10:

His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe  
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 14 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 11:

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg Ser Lys Tyr Leu  
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 27 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 12:

**GCAGAAGAAT TCGAGCTCGG CCCCCAG**

27

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 33 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 13:

**GATGATATCA GAGAGAAATA CATACTAACA CAC**

33

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 14:

## ES 2 152 424 T5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

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

**CGGAAGAAAG AGACTTCGGC CGCTACTTAC**

**30**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 47 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 15:

**GTGTGTTAGT ATGTATTTCT CTCTGATATC TTCAGCTTCC AGCAGTG**

**47**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 16:

**TCTTCTAGAA GACCACGCTA C**

**21**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 17:

**GATGATATCC GGCCGAAGTC TCTTTCTTCC GTTGTC**

**36**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

## ES 2 152 424 T5

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 18:

**CAGGGTTATC AACACCCTGA AAAC**

24

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

20

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

**GTCACAGTTA TCCACTCTGT C**

21

25

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30

- (A) LONGITUD: 38 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

35

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

**CCGTCTCCTC AGGTACGGCC GGCCTCTCCA GGTCTTCG**

38

40

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

45

- (A) LONGITUD: 39 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

50

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

**CACAGTTATC CACTCTGTCT TTGATATCAC AGGTGTCCT**

39

55

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 22:

60

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 13 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

65

ES 2 152 424 T5

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

5 His Ser Leu Gly Lys Tyr Leu Gly His Pro Asp Lys Phe  
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 23:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 13 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

15 (C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

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

20 His Ser Leu Gly Lys Leu Leu Gly His Pro Asp Lys Phe  
1 5 10

<sup>25</sup> (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 aminoácidos

30 (B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 24:

Ser Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Arg Gly  
1 5 10 15

Arg

45 (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 13 aminoácidos

50 (B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 25:

Asn Leu Cys Asn Ile Pro Ser Cys Ala Leu Leu Ser Ser  
1 5 10

60

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

## ES 2 152 424 T5

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 26:

GGGGGGGGCCA TGGCCGAAGA CGACATTGAG GCCGAC

36

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 27:

GCGGCGACTA GTCCAGTGTT TCAGAACCGG CTG

33

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 28:

CCCCCGATA TCTCAGCTTC CAGCAGTGGA GACGACATTG AG

42

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 29:

CCCCCCC GGC CGCTACTTAC GTTTCAGTG TTTCAGAACC GG

42

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

## ES 2 152 424 T5

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

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

GGGGGGGCA TGGCCGAAA CTCCGAAAGG CATTTCG

37

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

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

GCGGCGACTA GTCCACTCCA CAGTGATGGG GC

32

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

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

CCCCCCCCGGC CGTACCTGAG GACCACTCCA CAGTGATGG

39

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 33:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 33:

CCCCCCGATA TCACAGGTGT CTTAAGTGCT AGCGGAGGGG GCGGAAGCGG CGGAGGGGGA

AACTCCGAAA GGCATTTC

## ES 2 152 424 T5

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 34:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 34:

AGCTTGATAT CACAGGTGTC TTAAGTGGAG

30

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 35:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 35:

CTAGCTCCAC TTAAGACACC TGTGATATCA

30

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 36:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 34 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 36:

TCCGGAGGCG GCGGAGACTC CGAAAGGCAT TTCG

34

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 37:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 39 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

## ES 2 152 424 T5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 37:

CGATCGCTAGA CGGCGGTGGT GGTTCGGTG GCGGCGGAG

5 39

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 38:

10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 38:

20

CCCCCAGGC TTCCCGGGCC ACCATGCCGT GAGCAGAGC TC

42

25

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 39:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

35

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 39:

CCCCCCGAGC TCGAATTCTC ATAAAGGCC TGGGTGTCTG

40

40

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 40:

45

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

50

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 40:

55

CCCCCAAGC TTCCCGGGCC ACCATGGCTC TGCAGATCCC CAGC

44

60

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 41:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 34 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

65

## ES 2 152 424 T5

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 41:

CCCCCCTT AAGGTCCTTG GGCTGCTCAG CACC

34

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 42:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 42:

CCCCCCCCAT CACTGTGGAG TGGAGGG

27

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 43:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 43:

CCCCCGAGC TCGAATTCTC ACTGCAGGAG CCCTGCTGG

39

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 44:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 44:

GGGGGGAAGC TTATGATCAA AGAAGAACAT GTGATCATC

39

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 45:

## ES 2 152 424 T5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 45:

GCGGCGGGAT CCGTTCTCTG TAGTCTCTGG GAGAGG

36

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 46:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 46:

GGGGGGAAGC TTATGGGGGA CACCCGACCA CGTTTCTTGT GGCAGC

46

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 47:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 47:

GGGGGGCCA TGGCCATCAA AGAAGAACAT GTGATCATC

39

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 48:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 48:

GCGGCGACTA GTGTTCTCTG TAGTCTCTGG GAGAGG

36

## ES 2 152 424 T5

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 49:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 49:

GGGGGGAAGC TTGATATCTC AGCTTCCAC AGTAGTATCA AAGAAGAA-  
CA TGTGATC 57

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 50:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 45 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 50:

GGGGGGCGGC CGCTACTTAC GTTCTCTGG GAGAGGGCTT GGAGC  
45

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 51:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 35 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 51:

GCGGCGGGAT CCCTTGCTCT GTGCAGATTC AGACC  
35

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 52:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 51 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

## ES 2 152 424 T5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 52:

GGGGGGGCCA TGGCCGGATC CGCTAGCGGG GACACCCGAC  
CACGTTTCTTG 51

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 53:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 53:

GCGGCGACTA GTCTTGCTCT GTGCAGATTC AGACCG  
36

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 54:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 56 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 54:

GTTGTCTTAA GTGGAGCTAG CGGAGGGGGC GGGTCCGGAG  
GTGGTGGGGA CACCCG 56

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 55:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 57 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 55:

GAAATGACAT TCAAACCTTCA GCTGCCACAA GAAACGTGGT  
CGGGTGTCCC CACCACC 57

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 56:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

## ES 2 152 424 T5

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 56:

GGGGGGCGGC CGTACCTGAG GACTTGCTCT GTGCAGATTC AG

42

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 57:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 58 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 57:

TTAAGTATCT CTCAGGCTGT TCACGCTGCT CACGCTGAAA TCAAC-  
GAAGC TGGTCGTG 58

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 58:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 58 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 58:

CTAGCACGAC CAGCTTCGTT GATTTTCAGCC TGAGCAGCGT GAA-  
CAGCCTG AGAGATAC 58

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 59:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 58 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 59:

TTAAGTATCT CTCAGGCTGT TCACGCTGCT CGGGCTGAAA TCAAC-  
GAAGC TGGTCGTG 58

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 60:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

## ES 2 152 424 T5

(A) LONGITUD: 58 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 60:

CTAGCACGAC CAGCTTCGTT GATTTCAGCC CGAGCAGCGT GAA-  
CAGCCTG AGAGATAC 58

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 61:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 58 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 61:

TTAAGTATCT CTCAGGCTGT TCACGCTGCT CACTACGAAA TCAAC-  
GAAGC TGGTCGTG 58

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 62:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 58 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 62:

CTAGCACGAC CAGCTTCGTT GATTTCATAG TGAGGCAGCGT GA-  
CAGCCTG AGAGATACA 58

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 63:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 63:

TTAAGTAACC TGTGCAACAT CCCCTGCAGC GCCCTGCTGA GCTCCG

## ES 2 152 424 T5

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 64:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 46 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 64:

CTAGCGGAGC TCAGCAGGGC GCTGCAGGGG ATGTTGCACA GGTTAC

46

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 65:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 65:

TTAAGTCAGA TCAGCGTGCA GCCCGCCTTC AGCGTGCAGG

40

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 66:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 66:

CTAGCCTGCA CGCTGAAGGC GGGCTGAACG CTGATCTGAC

40

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 67:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 46 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

## ES 2 152 424 T5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 67:

TTAAGTCCCA AGTACGTGAA GCAGAACACC CTGAAGCTGG CCACCG  
46

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 68:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 68:

CTAGCGGTGG CCAGCTTCAG GGTGTTCTGC TTCACGTACT TGGGAC  
46

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 69:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 69:

TTAAGTCACT ATGGCTCCCT GCCGCAGAAG TCCCAGCACG GGCGCG  
46

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 70:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 70:

CTAGCGCGCC CGTGCTGGGA CTTCTGCGGC AGGGAGCCAT AGTGAC  
46

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 71:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

## ES 2 152 424 T5

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 71:

TTACATCACT CCCTGGGCAA GTGGCTGGGC CACCCGGACA AGTTCG

46

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 72:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 72:

CTAGCGAACT TGTTCCGGGTG GCCCAGCCAC TTGCCCAGGG AGTGAC

46

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 73:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 49 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 73:

TTAAGTATGG CATCCCAGAA GCGCCCGTCC CAGCGCTCCA AC-  
TACCTGG 49

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 74:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 49 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 74:

CTAGCCAGGT ACTTGGAGCG CTGGAGCGGG CGCTTCTGGG ATGCCA-  
TAC 49

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 75:

## ES 2 152 424 T5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 75:

GATATCTCAG CTTCCAGCAG TGAAGACGAC ATTGAGGCCG ACCAC  
45

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 76:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 76:

CCGGTTCTGA AACACTGGAA ACGTAAGTAG CGGCCG  
46

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 77:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 77:

Ser Ser Ser Glu Asp Asp Ile Glu Ala Asp His  
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 78:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 78:

Pro Val Leu Lys His Trp Lys Arg  
1 5

## ES 2 152 424 T5

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 79:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 72 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 79:

**GATATCACAG GTGTCTTAAG TGGAGCTAGC GGAGGGGGCG GAAGCGGCGG AGGGGGAAAC 60**  
**TCCGAAAGGC AT 72**

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 80:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 33 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 80:

**ATCACTGTGG AGTGGTCCTC AGGTACGGCC GCC**  
**33**

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 81:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 81:

**Val Leu Ser Gly Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asn**  
**1 5 10 15**  
**Ser Glu Arg His**  
**20**

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 82:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 7 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

## ES 2 152 424 T5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 82:

**Ile Thr Val Glu Trp Ser Ser**  
**1 5**

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 83:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 83:

20 **GATATCTCAG CTTCCAGCACG TGAAGACGAC ATTGAGGCCG ACCAC**  
**45**

25

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 84:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

35 (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 84:

40 **CCGGTTCTGA AACACTGGAA ACGTAAGTAG CGGCCG**  
**36**

45 (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 85:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

50 (C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 85:

55

**Ser Ser Ser Glu Asp Asp Ile Glu Ala Asp His**  
**1 5 10**

60

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 86:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

65

## ES 2 152 424 T5

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 86:

**Pro Val Leu Lys His Trp Lys Arg**  
**1 5**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 87:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 72 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 87:

**GATATCACAG GTGTCTTAAG TGGAGCTAGC GGC GGTGGTG GTTCCGGTGG CGGCGGAGAC 60**  
**TCCGAAAGGC AT 72**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 88:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 88:

**ATCACTGTGG AGTGGTCCTC AGGTACGGCC GCC**  
**33**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 89:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 89:

**Val Leu Ser Gly Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asp**  
**1 5 10 15**  
**Ser Glu Arg His**  
**20**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 90:

## ES 2 152 424 T5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 7 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 90:

Ile Thr Val Glu Trp Ser Ser  
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 91:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 45 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 91:

GATATCTCAG CTTCCAGCAG TATCAAAGAA GAACATGTGA TCATC  
45

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 92:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 36 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 92:

CCAGAGACTA GAGAGAACAA ACGTAAGTAG CGGCCG  
36

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 93:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 11 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 93:

Ser Ser Ser Ile Lys Glu Glu His Val Ile Ile  
1 5 10

## ES 2 152 424 T5

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 94:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 8 aminoácidos  
 (B) TIPO: aminoácido  
 (C) TIPO DE HEBRA: desconocido  
 10 (D) TOPOLOGÍA: desconocida

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 94:

15 **Pro Glu Thr Thr Glu Asn Lys Arg**  
**1 5**

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 95:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 90 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE HEBRA: desconocido  
 30 (D) TOPOLOGÍA: desconocida

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 95:

35 **GATATCACAG GTGTCTTAAG TGGAGCTAGC GGAGCGGGCG GGTTCGGAGG TGGTGGGGAC 60**  
**ACCCGACCAC GTTCTTGTG GCAGCTGAAG 90**

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 96:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 37 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE HEBRA: desconocido  
 50 (D) TOPOLOGÍA: desconocida

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 96:

55 **TCTGAATCTG CACAGAGCAA GTCCTCAGGT ACGGCCG**  
**37**

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 97:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 65 (A) LONGITUD: 26 aminoácidos  
 (B) TIPO: aminoácido  
 (C) TIPO DE HEBRA: desconocido

## ES 2 152 424 T5

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 97:

5  
Val Leu Ser Gly Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asp  
1 5 10 15  
10 Thr Arg Pro Arg Phe Leu Trp Gln Leu Lys  
20 25

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 98:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 9 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(C) TIPO DE HEBRA: desconocido  
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 98:

30 Ser Glu Ser Ala Gln Ser Lys Ser Ser  
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 99:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 28 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE HEBRA: desconocido  
40 (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 99:

45 GTCCAGCTGT CTTGTTTCAG TACTGATC  
28

50 (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 100:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 14 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE HEBRA: desconocido  
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 100:

GTAAGTAGCG GCCG  
65 14

## ES 2 152 424 T5

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 101:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 101:

GGTATGTAAA AATAAACATC ACAG

24

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 102:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 102:

GCTTTGCTTA CGGAGTTACT C

21

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 103:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 95 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 103:

CCCGGGCCAC CATGCCGTGC AGCAGAGCTC TGATTCTGGG GGTCCCTCGCC CTGAACACCA

60

TGCTCAGCCT CTGCGGAGGT GAAGACGACA TTGAG

95

### (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 104:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 28 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

ES 2 152 424 T5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 105:

5 Met Pro Cys Ser Arg Ala Leu Ile Leu Gly Val Leu Ala Leu Asn Thr  
1 5 10 15  
Met Leu Ser Leu Cys Gly Gly Glu Asp Asp Ile Glu  
20 25

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 106:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

20

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 106:

25

Arg Ser Gly Gly Thr Ser Arg His Pro Gly Pro Leu  
1 5 10

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 107:

35

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 194 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

40

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 107:

45

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| AAGCTTCCCG GGCCACCATG GCTCTGCAGA TCCCCAGCCT CCTCCTCTCA GCTGCTGTGG | 60  |
| TGGTGCTGAT GGTGCTGAGC AGCCCAAGGA CCTTAAGTAT CTCTCAGGCT GTTCACGCTG | 120 |
| CTCACGCTGA AATCAACGAA GCTGGTCGTG CTAGCGGAGG GGGCGGAAGC GGCGGAGGGG | 180 |
| GAAACTCCGA AAGG                                                   | 194 |

55

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 108:

60

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

65

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

## ES 2 152 424 T5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 108:

CCTCCTCCAG CAGGGCTCCT GCAGTGAGAA TTCGAGCTC

5

39

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 109:

10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 59 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 109:

20

Met Ala Leu Gln Ile Pro Ser Leu Leu Leu Ser Ala Ala Val Val Val  
1 5 10 15

25

Leu Met Val Leu Ser Ser Pro Arg Thr Leu Ser Ile Ser Gln Ala Val  
20 25 30

His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg Ala Ser Gly Gly  
35 40 45

30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Asn Ser Glu Arg  
50 55

35 (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 110:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

40

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

45

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 110:

Pro Pro Pro Ala Gly Leu Leu Gln  
1 5

50

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 111:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55

(A) LONGITUD: 43 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

60

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 111:

CCCCCCCCGC GGCCGCCCCA CCATGGGACT GAGTAACATT CTC

65

43

## ES 2 152 424 T5

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 112:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 112:

CCCCCCGCGG CCGCTTTAAA AACATGTATC ACTTTT

36

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 113:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 113:

CCCCCCGCCA TGGCCGCTAG CGGAGGGGGC GGAAGC

36

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 114:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 114:

CCCGGGGCCT CGAGTGAAGA CGACATTGAG GCCGAC

36

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 115:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

## ES 2 152 424 T5

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 115:

CCCCCCTACTA TGCCACTCCA CAGTGATGGG GCT

33

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 116:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 116:

CCCCCCCCCG GGACCAGTGT TTCAGAACCG GCTCCTC

37

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 117:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 65 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 117:

TCGAGGAACC GCCACCGCCA GAACCGCCGC CACCGGAACC ACCACCGCCG CTGCCACCGC

60

CACCA

65

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 118:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 65 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

ES 2 152 424 T5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 118:

CTAGTGGTG CGGTGCGAC GGC GGTTGGTG GTTCGGTG CCGCGTTCT GGC GGTTGGC  
60

GTTCC  
65

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 119:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 119:

25

CTTGGGAATC TTGACTAAGA GG

22

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 120:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 60 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 120:

45

CAGGTCGAAT TCTCATTCCA TCGGCATGTA CTCTTCTTCC TCCCAGTGTT

50 TCAGAACCGG 60

55

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 121:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1385 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

# ES 2 152 424 T5

(B) SITUACIÓN: 6..1382

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 121:

|    |                                                                                                                                                       |     |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5  | CCACC ATG GCT CTG CAG ATC CCC AGC CTC CTC CTC TCA GCT GCT GTG<br>Met Ala Leu Gln Ile Pro Ser Leu Leu Ser Ala Ala Val<br>1 5 10                        | 47  |
| 10 | GTG GTG CTG ATG GTG CTG AGC AGC CCA AGG ACC TTA AGT ATC TCT CAG<br>Val Val Leu Met Val Leu Ser Ser Pro Arg Thr Leu Ser Ile Ser Gln<br>15 20 25 30     | 95  |
| 15 | GCT GTT CAC GCT GCT CAC GCT GAA ATC AAC GAA GCT GGT CGT GCT AGC<br>Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg Ala Ser<br>35 40 45        | 143 |
|    | GGA GGG GGC GGA AGC GGC GGA GGG GGA AAC TCC GAA AGG CAT TTC GTG<br>Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asn Ser Glu Arg His Phe Val<br>50 55 60                | 191 |
| 20 | GTC CAG TTC AAG GGC GAG TGC TAC TAC ACC AAC GGG ACG CAG CGC ATA<br>Val Gln Phe Lys Gly Glu Cys Tyr Tyr Thr Asn Gly Thr Gln Arg Ile<br>65 70 75        | 239 |
| 25 | CGG CTC GTG ACC AGA TAC ATC TAC AAC CGG GAG GAG TAC GTG CGC TAC<br>Arg Leu Val Thr Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Tyr Val Arg Tyr<br>80 85 90        | 287 |
|    | GAC AGC GAC GTG GCC GAG TAC CGC GCG GTG ACC GAG CTG GGG CGG CCA<br>Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg Pro<br>95 100 105 110  | 335 |
| 30 | GAC GCC GAG TAC TGG AAC AGC CAG CCG GAG ATC CTG GAG CGA ACG CGG<br>Asp Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Pro Glu Ile Leu Glu Arg Thr Arg<br>115 120 125     | 383 |
| 35 | GCC GAG GTG GAC ACG GCG TGC AGA CAC AAC TAC GAG GGG CCG GAG ACC<br>Ala Glu Val Asp Thr Ala Cys Arg His Asn Tyr Glu Gly Pro Glu Thr<br>130 135 140     | 431 |
| 40 | AGC ACC TCC CTG CGG CGG CTT GAA CAG CCC AAT GTC GCC ATC TCC CTG<br>Ser Thr Ser Leu Arg Arg Leu Glu Gln Pro Asn Val Ala Ile Ser Leu<br>145 150 155     | 479 |
|    | TCC AGG ACA GAG GCC CTC AAC CAC CAC AAC ACT CTG GTC TGT TCG GTG<br>Ser Arg Thr Glu Ala Leu Asn His His Asn Thr Leu Val Cys Ser Val<br>160 165 170     | 527 |
| 45 | ACA GAT TTC TAC CCA GCC AAG ATC AAA GTG CGC TGG TTC AGG AAT GGC<br>Thr Asp Phe Tyr Pro Ala Lys Ile Lys Val Arg Trp Phe Arg Asn Gly<br>175 180 185 190 | 575 |
| 50 | CAG GAG GAG ACA GTG GGG GTC TCA TCC ACA CAG CTT ATT AGG AAT GGG<br>Gln Glu Glu Thr Val Gly Val Ser Ser Thr Gln Leu Ile Arg Asn Gly<br>195 200 205     | 623 |
|    | GAC TGG ACC TTC CAG GTC CTG GTC ATG CTG GAG ATG ACC CCT CAT CAG<br>Asp Trp Thr Phe Gln Val Leu Val Met Leu Glu Met Thr Pro His Gln<br>210 215 220     | 671 |
| 55 | GGA GAG GTC TAC ACC TGC CAT GTG GAG CAT CCC AGC CTG AAG AGC CCC<br>Gly Glu Val Tyr Thr Cys His Val Glu His Pro Ser Leu Lys Ser Pro<br>225 230 235     | 719 |
| 60 | ATC ACT GTG GAG TGG ACT AGT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGT GGT<br>Ile Thr Val Glu Trp Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly<br>240 245 250     | 767 |

65

# ES 2 152 424 T5

|    |                                                                                                                                                       |      |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 5  | TCC GGT GGC GGC GGT TCT GGC GGT GGC GGT TCC TCG AGT GAA GAC GAC<br>Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Glu Asp Asp<br>255 260 265 270 | 815  |
| 10 | ATT GAG GCC GAC CAC GTA GGC TTC TAT GGT ACA ACT GTT TAT CAG TCT<br>Ile Glu Ala Asp His Val Gly Phe Tyr Gly Thr Thr Val Tyr Gln Ser<br>275 280 285     | 863  |
| 15 | CCT GGA GAC ATT GGC CAG TAC ACA CAT GAA TTT GAT GGT GAT GAG TTG<br>Pro Gly Asp Ile Gly Gln Tyr Thr His Glu Phe Asp Gly Asp Glu Leu<br>290 295 300     | 911  |
| 20 | TTC TAT GTG GAC TTG GAT AAG AAG AAA ACT GTC TGG AGG CTT CCT GAG<br>Phe Tyr Val Asp Leu Asp Lys Lys Lys Thr Val Trp Arg Leu Pro Glu<br>305 310 315     | 959  |
| 25 | TTT GGC CAA TTG ATA CTC TTT GAG CCC CAA GGT GGA CTG CAA AAC ATA<br>Phe Gly Gln Leu Ile Leu Phe Glu Pro Gln Gly Gly Leu Gln Asn Ile<br>320 325 330     | 1007 |
| 30 | GCT GCA GAA AAA CAC AAC TTG GGA ATC TTG ACT AAG AGG TCA AAT TTC<br>Ala Ala Glu Lys His Asn Leu Gly Ile Leu Thr Lys Arg Ser Asn Phe<br>335 340 345 350 | 1055 |
| 35 | ACC CCA CCT ACC AAT GAG GCT CCT CAA GCG ACT GTG TTC CCC AAG TCC<br>Thr Pro Ala Thr Asn Glu Ala Pro Gln Ala Thr Val Phe Pro Lys Ser<br>355 360 365     | 1103 |
| 40 | CCT GTG CTG CTG GGT CAG CCC AAC ACC CTT ATC TGC TTT GTG GAC AAC<br>Pro Val Leu Leu Gly Gln Pro Asn Thr Leu Ile Cys Phe Val Asp Asn<br>370 375 380     | 1151 |
| 45 | ATC TTC CCA CCT GTG ATC AAC ATC ACA TGG CTC AGA AAT AGC AAG TCA<br>Ile Phe Pro Pro Val Ile Asn Ile Thr Trp Leu Arg Asn Ser Lys Ser<br>385 390 395     | 1199 |
| 50 | GTC ACA GAC GGC GTT TAT GAG ACC AGC TTC CTC GTC AAC CGT GAC CAT<br>Val Thr Asp Gly Val Tyr Glu Thr Ser Phe Leu Val Asn Arg Asp His<br>400 405 410     | 1247 |
|    | TCC TTC CAC AAG CTG TCT TAT CTC ACC TTC ATC CCT TCT GAT GAT GAC                                                                                       | 1295 |
|    | Ser Phe His Lys Leu Ser Tyr Leu Thr Phe Ile Pro Ser Asp Asp Asp<br>415 420 425 430                                                                    |      |
|    | ATT TAT GAC TGC AAG GTG GAG CAC TGG GGC CTG GAG GAG CCG GTT CTG<br>Ile Tyr Asp Cys Lys Val Glu His Trp Gly Leu Glu Glu Pro Val Leu<br>435 440 445     | 1343 |
|    | AAA CAC TGG TCC CGG GCT AGT CAC CAT CAC CAT CAT CAC TAG<br>Lys His Trp Ser Arg Ala Ser His His His His His His<br>450 455                             | 1385 |

## (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 122:

### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1508 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

### (ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) SITUACIÓN: 6..1505

# ES 2 152 424 T5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 122:

|    |                                                                                                                                                       |     |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5  | CCACC ATG GCT CTG CAG ATC CCC AGC CTC CTC CTC TCA GCT GCT GTG<br>Met Ala Leu Gln Ile Pro Ser Leu Leu Leu Ser Ala Ala Val<br>460 465 470               | 47  |
| 10 | GTG GTG CTG ATG GTG CTG AGC AGC CCA AGG ACC TTA AGT ATC TCT CAG<br>Val Val Leu Met Val Leu Ser Ser Pro Arg Thr Leu Ser Ile Ser Gln<br>475 480 485     | 95  |
| 15 | GCT GTT CAC GCT GCT CAC GCT GAA ATC AAC GAA GCT GGT CGT GCT AGC<br>Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg Ala Ser<br>490 495 500 505 | 143 |
| 20 | GGA GGG GGC GGA AGC GGC GGA GGG GGA AAC TCC GAA AGG CAT TTC GTG<br>Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asn Ser Glu Arg His Phe Val<br>510 515 520     | 191 |
| 25 | GTC CAG TTC AAG GGC GAG TGC TAC TAC ACC AAC GGG ACG CAG CGC ATA<br>Val Gln Phe Lys Gly Glu Cys Tyr Tyr Thr Asn Gly Thr Gln Arg Ile<br>525 530 535     | 239 |
| 30 | CGG CTC GTG ACC AGA TAC ATC TAC AAC CGG GAG GAG TAC GTG CGC TAC<br>Arg Leu Val Thr Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Tyr Val Arg Tyr<br>540 545 550     | 287 |
| 35 | GAC AGC GAC GTG GGC GAG TAC CGC GCG GTG ACC GAG CTG GGG CGG CCA<br>Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Tyr Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg Pro<br>555 560 565 | 335 |
| 40 | GAC GCC GAG TAC TGG AAC AGC CAG CCG GAG ATC CTG GAG CGA ACG CGG<br>Asp Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Pro Glu Ile Leu Glu Arg Thr Arg<br>570 575 580 585 | 383 |
| 45 | GCC GAG GTG GAC ACG GCG TGC AGA CAC AAC TAC GAG GGG CCG GAG ACC<br>Ala Glu Val Asp Thr Ala Cys Arg His Asn Tyr Glu Gly Pro Glu Thr<br>590 595 600     | 431 |
| 50 | AGC ACC TCC CTG CGG CGG CTT GAA CAG CCC AAT GTC GCC ATC TCC CTG<br>Ser Thr Ser Leu Arg Arg Leu Glu Gln Pro Asn Val Ala Ile Ser Leu<br>605 610 615     | 479 |
| 55 | TCC AGG ACA GAG GCC CTC AAC CAC CAC AAC ACT CTG GTC TGT TCG GTG<br>Ser Arg Thr Glu Ala Leu Asn His His Asn Thr Leu Val Cys Ser Val<br>620 625 630     | 527 |
| 60 | ACA GAT TTC TAC CCA GCC AAG ATC AAA GTG CGC TGG TTC AGG AAT GGC<br>Thr Asp Phe Tyr Pro Ala Lys Ile Lys Val Arg Trp Phe Arg Asn Gly<br>635 640 645     | 575 |
| 65 | CAG GAG GAG ACA GTG GGG GTC TCA TCC ACA CAG CTT ATT AGG AAT GGG<br>Gln Glu Glu Thr Val Gly Val Ser Ser Thr Gln Leu Ile Arg Asn Gly<br>650 655 660 665 | 623 |
| 70 | GAC TGG ACC TTC CAG GTC CTG GTC ATG CTG GAG ATG ACC CCT CAT CAG<br>Asp Trp Thr Phe Gln Val Leu Val Met Leu Glu Met Thr Pro His Gln<br>670 675 680     | 671 |
| 75 | GGA GAG GTC TAC ACC TGC CAT GTG GAG CAT CCC AGC CTG AAG AGC CCC<br>Gly Glu Val Tyr Thr Cys His Val Glu His Pro Ser Leu Lys Ser Pro<br>685 690 695     | 719 |

# ES 2 152 424 T5

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
|    | ATC | ACT | GTG | GAG | TGG | ACT | AGT | GGT | GGC | GGT | GGC | AGC | GGC | GGT | GGT | GGT | 767  |
|    | Ile | Thr | Val | Glu | Trp | Thr | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly |      |
|    |     |     | 700 |     |     |     |     | 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |      |
| 5  | TCC | GGT | GGC | GGC | GGT | TCT | GGC | GGT | GGC | GGT | TCC | TCG | AGT | GAA | GAC | GAC | 815  |
|    | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Ser | Ser | Glu | Asp | Asp |      |
|    |     | 715 |     |     |     |     | 720 |     |     |     |     | 725 |     |     |     |     |      |
| 10 | ATT | GAG | GCC | GAC | CAC | GTA | GGC | TTC | TAT | GGT | ACA | ACT | GTT | TAT | CAG | TCT | 863  |
|    | Ile | Glu | Ala | Asp | His | Val | Gly | Phe | Tyr | Gly | Thr | Thr | Val | Tyr | Gln | Ser |      |
|    |     | 730 |     |     |     | 735 |     |     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |      |
|    | CCT | GGA | GAC | ATT | GGC | CAG | TAC | ACA | CAT | GAA | TTT | GAT | GGT | GAT | GAG | TTG | 911  |
|    | Pro | Gly | Asp | Ile | Gly | Gln | Tyr | Thr | His | Glu | Phe | Asp | Gly | Asp | Glu | Leu |      |
|    |     |     |     |     | 750 |     |     |     |     | 755 |     |     |     |     | 760 |     |      |
| 15 | TTC | TAT | GTG | GAC | TTG | GAT | AAG | AAG | AAA | ACT | GTC | TGG | AGG | CTT | CCT | GAG | 959  |
|    | Phe | Tyr | Val | Asp | Leu | Asp | Lys | Lys | Lys | Thr | Val | Trp | Arg | Leu | Pro | Glu |      |
|    |     |     |     | 765 |     |     |     |     | 770 |     |     |     |     | 775 |     |     |      |
| 20 | TTT | GGC | CAA | TTG | ATA | CTC | TTT | GAG | CCC | CAA | GGT | GGA | CTG | CAA | AAC | ATA | 1007 |
|    | Phe | Gly | Gln | Leu | Ile | Leu | Phe | Glu | Pro | Gln | Gly | Gly | Leu | Gln | Asn | Ile |      |
|    |     |     | 780 |     |     |     |     | 785 |     |     |     |     | 790 |     |     |     |      |
|    | GCT | GCA | GAA | AAA | CAC | AAC | TTG | GGA | ATC | TTG | ACT | AAG | AGG | TCA | AAT | TTC | 1055 |
|    | Ala | Ala | Glu | Lys | His | Asn | Leu | Gly | Ile | Leu | Thr | Lys | Arg | Ser | Asn | Phe |      |
|    |     |     | 795 |     |     |     | 800 |     |     |     |     | 805 |     |     |     |     |      |
| 25 | ACC | CCA | GCT | ACC | AAT | GAG | GCT | CCT | CAA | GCG | ACT | GTG | TTC | CCC | AAG | TCC | 1103 |
|    | Thr | Pro | Ala | Thr | Asn | Glu | Ala | Pro | Gln | Ala | Thr | Val | Phe | Pro | Lys | Ser |      |
|    |     |     |     |     |     | 815 |     |     |     |     | 820 |     |     |     |     | 825 |      |
| 30 | CCT | GTG | CTG | CTG | GGT | CAG | CCC | AAC | ACC | CTT | ATC | TGC | TTT | GTG | GAC | AAC | 1151 |
|    | Pro | Val | Leu | Leu | Gly | Gln | Pro | Asn | Thr | Leu | Ile | Cys | Phe | Val | Asp | Asn |      |
|    |     |     |     |     | 830 |     |     |     |     | 835 |     |     |     |     | 840 |     |      |
| 35 | ATC | TTC | CCA | CCT | GTG | ATC | AAC | ATC | ACA | TGG | CTC | AGA | AAT | AGC | AAG | TCA | 1199 |
|    | Ile | Phe | Pro | Pro | Val | Ile | Asn | Ile | Thr | Trp | Leu | Arg | Asn | Ser | Lys | Ser |      |
|    |     |     |     | 845 |     |     |     |     | 850 |     |     |     |     | 855 |     |     |      |
|    | GTC | ACA | GAC | GGC | GTT | TAT | GAG | ACC | AGC | TTC | CTC | GTC | AAC | CGT | GAC | CAT | 1247 |
|    | Val | Thr | Asp | Gly | Val | Tyr | Glu | Thr | Ser | Phe | Leu | Val | Asn | Arg | Asp | His |      |
| 40 |     |     | 860 |     |     |     |     | 865 |     |     |     |     | 870 |     |     |     |      |
|    | TCC | TTC | CAC | AAG | CTG | TCT | TAT | CTC | ACC | TTC | ATC | CCT | TCT | GAT | GAT | GAC | 1295 |
|    | Ser | Phe | His | Lys | Leu | Ser | Tyr | Leu | Thr | Phe | Ile | Pro | Ser | Asp | Asp | Asp |      |
|    |     |     | 875 |     |     |     | 880 |     |     |     |     | 885 |     |     |     |     |      |
| 45 | ATT | TAT | GAC | TGC | AAG | GTG | GAG | CAC | TGG | GGC | CTG | GAG | GAG | CCG | GTT | CTG | 1343 |
|    | Ile | Tyr | Asp | Cys | Lys | Val | Glu | His | Trp | Gly | Leu | Glu | Glu | Pro | Val | Leu |      |
|    |     |     | 890 |     |     | 895 |     |     |     |     | 900 |     |     |     |     | 905 |      |
| 50 | AAA | CAC | TGG | GAA | CCT | GAG | ATT | CCA | GCC | CCC | ATG | TCA | GAG | CTG | ACA | GAA | 1391 |
|    | Lys | His | Trp | Glu | Pro | Glu | Ile | Pro | Ala | Pro | Met | Ser | Glu | Leu | Thr | Glu |      |
|    |     |     |     |     | 910 |     |     |     |     | 915 |     |     |     |     | 920 |     |      |
|    | ACT | GTG | GTG | TGT | GCC | CTG | GGG | TTG | TCT | GTG | GGC | CTT | GTG | GGC | ATC | GTG | 1439 |
|    | Thr | Val | Val | Cys | Ala | Leu | Gly | Leu | Ser | Val | Gly | Leu | Val | Gly | Ile | Val |      |
|    |     |     |     | 925 |     |     |     | 930 |     |     |     |     | 935 |     |     |     |      |
| 55 | GTG | GGC | ACC | ATC | TTC | ATC | ATT | CAA | GGC | CTG | CGA | TCA | GGT | GGC | ACC | TCC | 1487 |
|    | Val | Gly | Thr | Ile | Phe | Ile | Ile | Gln | Gly | Leu | Arg | Ser | Gly | Gly | Thr | Ser |      |
|    |     |     | 940 |     |     |     | 945 |     |     |     |     |     | 950 |     |     |     |      |
| 60 | AGA | CAC | CCA | GGG | CCT | TTA | TGA |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1508 |
|    | Arg | His | Pro | Gly | Pro | Leu |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|    |     |     |     | 955 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |

65 (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 123:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

## ES 2 152 424 T5

(A) LONGITUD: 1382 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) SITUACIÓN: 6..1382

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 123:

|    |                                                                                                                                                                  |     |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5  | <p>CCACC ATG GCT CTG CAG ATC CCC AGC CTC CTC CTC TCA GCT GCT GTG<br/> Met Ala Leu Gln Ile Pro Ser Leu Leu Leu Ser Ala Ala Val<br/> 505 510</p>                   | 47  |
| 20 | <p>GTG GTG CTG ATG GTG CTG AGC AGC CCA AGG ACC TTA AGT ATC TCT CAG<br/> Val Val Leu Met Val Leu Ser Ser Pro Arg Thr Leu Ser Ile Ser Gln<br/> 515 520 525 530</p> | 95  |
| 25 | <p>GCT GTT CAC GCT GCT CAC GCT GAA ATC AAC GAA GCT GGT CGT GCT AGC<br/> Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg Ala Ser<br/> 535 540 545</p>     | 143 |
| 30 | <p>GGA GGG GGC GGA AGC GGC GGA GGG GGA AAC TCC GAA AGG CAT TTC GTG<br/> Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asn Ser Glu Arg His Phe Val<br/> 550 555 560</p>     | 191 |
| 35 | <p>GTC CAG TTC AAG GGC GAG TGC TAC TAC ACC AAC GGG ACG CAG CGC ATA<br/> Val Gln Phe Lys Gly Glu Cys Tyr Tyr Thr Asn Gly Thr Gln Arg Ile<br/> 565 570 575</p>     | 239 |
| 40 | <p>CGG CTC GTG ACC AGA TAC ATC TAC AAC CGG GAG GAG TAC GTG CGC TAC<br/> Arg Leu Val Thr Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Tyr Val Arg Tyr<br/> 580 585 590</p>     | 287 |
| 45 | <p>GAC AGC GAC GTG GGC GAG TAC CGC GCG GTG ACC GAG CTG GGG CGG CCA<br/> Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg Pro<br/> 595 600 605 610</p> | 335 |
| 50 | <p>GAC GCC GAG TAC TGG AAC AGC CAG CCG GAG ATC CTG GAG CGA ACG CGG<br/> Asp Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Pro Glu Ile Leu Glu Arg Thr Arg<br/> 615 620 625</p>     | 383 |
| 55 | <p>GCC GAG GTG GAC ACG GCG TGC AGA CAC AAC TAC GAG GGG CCG GAG ACC<br/> Ala Glu Val Asp Thr Ala Cys Arg His Asn Tyr Glu Gly Pro Glu Thr<br/> 630 635 640</p>     | 431 |
| 60 | <p>AGC ACC TCC CTG CGG CGG CTT GAA CAG CCC AAT GTC GCC ATC TCC CTG<br/> Ser Thr Ser Leu Arg Arg Leu Glu Gln Pro Asn Val Ala Ile Ser Leu<br/> 645 650 655</p>     | 479 |
| 65 | <p>TCC AGG ACA GAG GCC CTC AAC CAC CAC AAC ACT CTG GTC TGT TCG GTG<br/> Ser Arg Thr Glu Ala Leu Asn His His Asn Thr Leu Val Cys Ser Val<br/> 660 665 670</p>     | 527 |

# ES 2 152 424 T5

|    |                                                                 |      |
|----|-----------------------------------------------------------------|------|
|    | ACA GAT TTC TAC CCA GCC AAG ATC AAA GTG CGC TGG TTC AGG AAT GGC | 575  |
|    | Thr Asp Phe Tyr Pro Ala Lys Ile Lys Val Arg Trp Phe Arg Asn Gly |      |
|    | 675 680 685 690                                                 |      |
| 5  | CAG GAG GAG ACA GTG GGG GTC TCA TCC ACA CAG CTT ATT AGG AAT GGG | 623  |
|    | Gln Glu Glu Thr Val Gly Val Ser Ser Thr Gln Leu Ile Arg Asn Gly |      |
|    | 695 700 705                                                     |      |
| 10 | GAC TGG ACC TTC CAG GTC CTG GTC ATG CTG GAG ATG ACC CCT CAT CAG | 671  |
|    | Asp Trp Thr Phe Gln Val Leu Val Met Leu Glu Met Thr Pro His Gln |      |
|    | 710 715 720                                                     |      |
|    | GGA GAG GTC TAC ACC TGC CAT GTG GAG CAT CCC AGC CTG AAG AGC CCC | 719  |
|    | Gly Glu Val Tyr Thr Cys His Val Glu His Pro Ser Leu Lys Ser Pro |      |
|    | 725 730 735                                                     |      |
| 15 | ATC ACT GTG GAG TGG ACT AGT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGT GGT | 767  |
|    | Ile Thr Val Glu Trp Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly |      |
|    | 740 745 750                                                     |      |
| 20 | TCC GGT GGC GGC GGT TCT GGC GGT GGC GGT TCC TCG AGT GAA GAC GAC | 815  |
|    | Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Glu Asp Asp |      |
|    | 755 760 765 770                                                 |      |
|    | ATT GAG GCC GAC CAC GTA GGC TTC TAT GGT ACA ACT GTT TAT CAG TCT | 863  |
|    | Ile Glu Ala Asp His Val Gly Phe Tyr Gly Thr Thr Val Tyr Gln Ser |      |
|    | 775 780 785                                                     |      |
| 25 | CCT GGA GAC ATT GGC CAG TAC ACA CAT GAA TTT GAT GGT GAT GAG TTG | 911  |
|    | Pro Gly Asp Ile Gly Gln Tyr Thr His Glu Phe Asp Gly Asp Glu Leu |      |
|    | 790 795 800                                                     |      |
| 30 | TTC TAT GTG GAC TTG GAT AAG AAG AAA ACT GTC TGG AGG CTT CCT GAG | 959  |
|    | Phe Tyr Val Asp Leu Asp Lys Lys Lys Thr Val Trp Arg Leu Pro Glu |      |
|    | 805 810 815                                                     |      |
|    | TTT GGC CAA TTG ATA CTC TTT GAG CCC CAA GGT GGA CTG CAA AAC ATA | 1007 |
|    | Phe Gly Gln Leu Ile Leu Phe Glu Pro Gln Gly Gly Leu Gln Asn Ile |      |
|    | 820 825 830                                                     |      |
| 35 | GCT GCA GAA AAA CAC AAC TTG GGA ATC TTG ACT AAG AGG TCA AAT TTC | 1055 |
|    | Ala Ala Glu Lys His Asn Leu Gly Ile Leu Thr Lys Arg Ser Asn Phe |      |
|    | 835 840 845 850                                                 |      |
| 40 | ACC CCA GCT ACC AAT GAG GCT CCT CAA GCG ACT GTG TTC CCC AAG TCC | 1103 |
|    | Thr Pro Ala Thr Asn Glu Ala Pro Gln Ala Thr Val Phe Pro Lys Ser |      |
|    | 855 860 865                                                     |      |
|    | CCT GTG CTG CTG GGT CAG CCC AAC ACC CTT ATC TGC TTT GTG GAC AAC | 1151 |
|    | Pro Val Leu Leu Gly Gln Pro Asn Thr Leu Ile Cys Phe Val Asp Asn |      |
|    | 870 875 880                                                     |      |
| 45 | ATC TTC CCA CCT GTG ATC AAC ATC ACA TGG CTC AGA AAT AGC AAG TCA | 1199 |
|    | Ile Phe Pro Pro Val Ile Asn Ile Thr Trp Leu Arg Asn Ser Lys Ser |      |
|    | 885 890 895                                                     |      |
| 50 | GTC ACA GAC GGC GTT TAT GAG ACC AGC TTC CTC GTC AAC CGT GAC CAT | 1247 |
|    | Val Thr Asp Gly Val Tyr Glu Thr Ser Phe Leu Val Asn Arg Asp His |      |
|    | 900 905 910                                                     |      |
|    | TCC TTC CAC AAG CTG TCT TAT CTC ACC TTC ATC CCT TCT GAT GAT GAC | 1295 |
|    | Ser Phe His Lys Leu Ser Tyr Leu Thr Phe Ile Pro Ser Asp Asp Asp |      |
|    | 915 920 925 930                                                 |      |
| 55 | ATT TAT GAC TGC AAG GTG GAG CAC TGG GGC CTG GAG GAG CCG GTT CTG | 1343 |
|    | Ile Tyr Asp Cys Lys Val Glu His Trp Gly Leu Glu Glu Pro Val Leu |      |
|    | 935 940 945                                                     |      |
| 60 | AAA CAC TGG GAG GAA GAA GAG TAC ATG CCG ATG GAA TGA             | 1382 |
|    | Lys His Trp Glu Glu Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu *               |      |
|    | 950 955                                                         |      |