



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1249490 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 5/08 (2006.01) **C12N 5/06** (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1993.02.18**

(30) Prioridade(s): **1992.02.19 US 0841662**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.10.16**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.09.19**
001/2007

(73) Titular(es):

THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE
10666 NORTH TORREY PINES ROAD LA JOLLA,
CALIFORNIA 92037 **US**

(72) Inventor(es):

PER A. PETERSON **US**
MICHAEL JACKSON **US**
PIERRE LANGLADE-DEMOYEN **FR**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **ACTIVAÇÃO DE CÉLULAS T CITOTÓXICAS IN VITRO**

(57) Resumo:

RESUMO

"Activação de células T citotóxicas *in vitro*"

A presente invenção refere-se a um meio racional, elaborado de produzir, carregar e utilizar moléculas de Classe I, em aplicações terapêuticas no tratamento de uma variedade de condições, incluindo cancro, tumores e neoplasias, bem como doenças virais, retrovirais, auto-imunes e do tipo auto-imune. A presente invenção refere-se a vectores, linhas celulares, moléculas de ADN recombinante que codificam microglobulina $\beta 2$ ou moléculas do MHC de Classe I numa forma solúvel e insolúvel, e métodos para produzir os mesmos.

DESCRIÇÃO

"Activação de células T citotóxicas *in vitro*"

ÂMBITO TÉCNICO

A presente invenção refere-se a métodos para activar células CD8 *in vitro*, com especificidade para péptidos antigénicos particulares, à utilização de células CD8 activadas *in vivo* para o tratamento de uma variedade de condições de doença, e a composições adequadas para estas utilizações.

ANTECEDENTES

A eficiência com que o sistema imunitário cura ou protege os indivíduos contra doenças infecciosas tem sido sempre intrigante para os cientistas, pois tem-se pensado que poderia ser possível activar o sistema imunitário para combater outros tipos de doenças. Estas doenças incluem o cancro, SIDA, hepatite e doenças infecciosas em pacientes imunossuprimidos. Apesar de se terem aplicado nestes tipos de doença, vários processos envolvendo a utilização de anticorpos, foram descritas poucas, se algumas, tentativas de sucesso utilizando células T citotóxicas. Teoricamente, as células T citotóxicas seriam o meio preferido para tratar os tipos de doenças referidos acima. No entanto, não estão disponíveis processos *in vitro* para activar especificamente as células T citotóxicas.

As células T citotóxicas, ou células CD8 como são actualmente conhecidas, representam a linha de defesa principal contra infecções virais. Os linfócitos CD8 reconhecem especificamente, e matam, células que estão infectadas por um vírus. Assim, o custo de eliminar uma infecção viral é a perda concomitante das células infectadas. Os receptores de células T na superfície das células CD8 não conseguem reconhecer antígenos estranhos directamente. Ao contrário dos anticorpos, o antígeno tem que ser primeiro apresentado aos receptores.

A apresentação de antígenos a células T é realizada por moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) do tipo Classe I. O complexo de histocompatibilidade principal (MHC) refere-se a um grande *locus* genético, que codifica uma família extensa de glicoproteínas, que desempenham um papel importante na resposta imunitária. Os genes do MHC, que também são designados por complexo HLA (antígeno de leucócitos humanos), estão localizados no cromossoma 6 em humanos. As moléculas codificadas pelos genes do MHC estão presentes nas superfícies celulares e são em grande parte responsáveis pelo reconhecimento de transplantes de tecido como "não-próprios". Assim, as moléculas de MHC ligadas à membrana estão intimamente envolvidas no reconhecimento de antígenos pelas células T.

Os produtos do MHC estão agrupados em três classes principais, referidas como I, II e III. As células T que servem essencialmente como células ajudantes, expressam CD4 e estão essencialmente restringidas às moléculas de Classe II, enquanto que as células que expressam CD8, que representam essencialmente células efectoras citotóxicas, interagem com moléculas de Classe I.

As moléculas de Classe I são glicoproteínas de membrana, com a capacidade de se ligar a péptidos derivados essencialmente da degradação intracelular de proteínas endógenas. Os complexos de moléculas do MHC com péptidos derivados de proteínas virais, bacterianas e outras proteínas estranhas, constituem o ligando que desencadeia a resposta das células T ao antígeno. Pelo contrário, os complexos de moléculas de MHC com péptidos derivados de produtos celulares normais, desempenham um papel de "ensinar" as células T a tolerar péptidos próprios, no timo. As moléculas de Classe I não apresentam antígenos inteiros, intactos; em vez disso, apresentam fragmentos de péptidos destes, "carregados" na sua "fenda de ligação ao péptido" ("*peptide binding groove*").

Em W091/16924 descrevem-se métodos para melhorar a apresentação de antígeno peptídico adicionado exogenamente por células apresentadoras de antígenos de mamífero. O método envolve proporcionar o antígeno peptídico exógeno às células

na presença de níveis elevados da proteína beta-2-microglobulina livre.

Levy e Kvist (*International Immunology*, 2(10), 995-1002 (1990)) descrevem a utilização de vectores de baculovírus separados para expressar MHC I, beta-2-microglobulina e proteína de adenovírus 2, separadamente e em conjunto, em células de insecto, para investigar os efeitos da proteína adenoviral sobre a montagem de complexos do MHC de Classe I.

Durante muitos anos os imunologistas tiveram a esperança de criar células citotóxicas específicas tendo como alvo vírus, retrovírus e células cancerosas. Embora se consigam de um modo geral atingir especificamente doenças virais *in vivo* através de vacinação com vacinas vivas ou atenuadas, não foi conseguido um sucesso similar com retrovírus ou com células cancerosas.

Em EP 360 205A descrevem-se métodos para estimular a resposta imunitária de um paciente de cancro contra o cancro. Os linfócitos do sangue periférico do paciente são expostos *in vitro* a células cancerosas do mesmo paciente que foi tratado com mitomicina C para impedir a proliferação. Os linfócitos estimulados são então novamente administrados ao paciente.

Em WO93/10816 descrevem-se vacinas de péptidos que podem ser utilizadas para induzir células T citotóxicas contra o HIV. Este documento sugere que as células T citotóxicas de indivíduos imunizados podem ser isoladas, cultivadas e expandidas *in vitro*, e re-administradas ao paciente para reforçar a resposta imunitária contra o vírus.

Além disso, a abordagem de vacina não teve a eficácia desejada em pacientes imunossuprimidos. Uma maneira de contornar esta dificuldade seria imunizar um indivíduo saudável, isolar as células CD8 desse indivíduo e injectar essas células CD8 na pessoa afectada pela doença. Este protocolo experimental parece funcionar em estirpes de ratinhos consanguíneos, mas não foi bem sucedida em seres humanos. Existem várias explicações possíveis. Primeiro que tudo, os péptidos são únicos para um determinado MHC; por outras palavras, certos péptidos antigénicos ligam-se

preferencialmente a espécies particulares do MHC e não se ligam bem a outras, mesmo na ausência da molécula do MHC "preferida". Adicionalmente, as moléculas do MHC são altamente polimórficas, facto este que gera pelo menos dois problemas. Em primeiro lugar, as células CD8 de um indivíduo apenas podem interagir com péptidos ligados precisamente às três a seis moléculas de Classe I presentes nesse indivíduo. Em segundo lugar, as células CD8 reagem violentamente com todas as moléculas de Classe I que são diferentes das que são expressas no indivíduo de quem são obtidas as células CD8, independentemente de que péptidos as moléculas de Classe I contêm. Esta reactividade foi observada há algum tempo e denomina-se alorreactividade. É a causa subjacente da rejeição imunitária de órgãos transplantados.

Assim, à parte o protocolo experimental, bastante heróico, em que um indivíduo é utilizado como dador de células CD8 activadas para outro indivíduo, é difícil encontrar duas pessoas não relacionadas que tenham exactamente o mesmo conjunto de moléculas de Classe I. Por este motivo, pelo menos um investigador utilizou a abordagem, bastante não específica, de "reforçar" células CD8 existentes, incubando-as *in vitro* com IL-2, um factor de crescimento para células T. No entanto, este protocolo (conhecido como terapia de células LAK) apenas irá permitir a expansão das células CD8 que já estavam activadas. Dado que o sistema imunitário está sempre activo, por um motivo ou outro, a maioria das células estimuladas com IL-2 serão irrelevantes para o fim de combater a doença. De facto, não está documentado que este tipo de terapia active quaisquer células com a especificidade desejada. Assim, os benefícios da terapia de células LAK são, no mínimo, controversos e os efeitos secundários são tipicamente tão graves, que muitos estudos foram descontinuados.

Algumas moléculas novas, que parecem estar envolvidas no processo de carga de péptidos, foram recentemente identificadas. Também se observou que as moléculas de Classe I sem péptido ligado (i.e. moléculas "vazias"), podem ser produzidas sob certas condições restritivas. Estas moléculas "vazias" são, no entanto, muitas vezes incapazes de atingir a superfície celular, dado que as moléculas de Classe I sem moléculas ligadas são muito termolábeis. Deste modo, as

moléculas de Classe I "vazias" desagregam-se durante o seu transporte, desde o interior da célula até à superfície da célula. Este é um meio elaborado, pelo qual o sistema imunitário pode assegurar que apenas as células que estão a sintetizar activamente proteínas virais são destruídas. Por exemplo, quando uma célula infectada viralmente é morta, ela irá libertar os péptidos virais. Se as células vizinhas estivessem a expressar moléculas de Classe I "vazias" - i.e., as que não têm péptido ligado - estas células seriam revestidas com os péptidos virais libertados. Uma vez que as células T citotóxicas (ou células CD8) não têm nenhum meio de determinar como, ou porque um péptido está ligado a uma molécula de Classe I, as células que obtiveram passivamente um revestimento com o péptido viral seriam também mortas, tal como as que estavam a sintetizar activamente as proteínas virais.

Os péptidos virais *in vivo* são degradados por uma partícula grande, conhecida como proteossoma. Este complexo enzimático também degrada proteínas celulares, normais, o que sugere que os péptidos que derivam das nossas próprias proteínas celulares competem com péptidos derivados viralmente, para os locais de ligação em moléculas de Classe I. Assim, apenas algumas das moléculas de Classe I na superfície de uma célula infectada viralmente, conteriam efectivamente péptidos virais, dado que a maioria das moléculas de Classe I conteriam péptidos derivados de quatro proteínas celulares, próprias. Uma vez que há dezenas de milhar de moléculas de Classe I na superfície de uma célula, e dado que as células CD8 reconhecem tão pouco quanto 200 moléculas de Classe I carregadas com um determinado péptido viral, esta competição entre péptidos derivados de vírus e proteínas celulares, não compromete completamente a eficácia com que as células CD8 podem destruir uma célula infectada viralmente. Apesar de tudo, se fosse possível "manipular" as células para que expressassem moléculas de Classe I que apresentem apenas uma espécie de péptido antigénico - i.e. se todas as moléculas de Classe I tivessem os mesmos péptidos ligados a elas - aumentaria consequentemente a eficácia da activação de CD8.

As moléculas de Classe I ligam péptidos de um modo específico. Todos os péptidos têm que ter cerca de 8-9 aminoácidos de comprimento e as suas sequências devem ajustar-se à fenda de ligação ao péptido, das moléculas de Classe I. A este respeito, as moléculas de Classe I apresentam alguma semelhança com os anticorpos. No entanto, apesar de um determinado anticorpo ter tendência para se ligar apenas a um antigénio, uma dada molécula de Classe I pode ligar muitas centenas de péptidos diferentes. Dado que o número de vírus e outros patogénios é bastante grande, torna-se claro que a nossa defesa imunitária seria pobre, se apenas tivéssemos uma única molécula de Classe I, mesmo que esta fosse capaz de se ligar e alterar muitos péptidos diferentes. Por estes motivos, todos os humanos têm entre cerca de três a seis moléculas de Classe I diferentes, que podem, cada uma, ligar muitos tipos diferentes de péptidos. Deste modo, as células CD8 podem reconhecer muitos milhares de péptidos ligados a uma, ou outra molécula de Classe I.

Dado que a selecção parece ser a força dominante na evolução, surgem patogénios que não podem ser reconhecidos eficazmente pelo sistema imunitário. Assim, uma sequência viral, que origina péptidos que se ligam eficazmente a uma variedade de moléculas de Classe I, pode mutar de uma forma tal, que não é reconhecida por nenhuma das três a seis moléculas de Classe I presentes num indivíduo. Este vírus pode, portanto, não ser reconhecido pelo sistema imunitário e pode, conseqüentemente, provocar a morte do indivíduo afectado. Se todos os indivíduos tivessem um conjunto idêntico de moléculas de Classe I, este vírus poderia, de forma conceptível, eliminar uma espécie inteira. No entanto, a variação individual é uma segurança contra essa possibilidade, dado que estão presentes cerca de 100 formas diferentes de moléculas de Classe I, na população. Assim, um vírus mutado pode lesar alguns indivíduos, mas é pouco provável que resulte na extinção de uma população inteira, dado que diferentes indivíduos possuem diferentes conjuntos de moléculas de Classe I.

Se as moléculas de Classe I se podem ligar a uma variedade de péptidos, incluindo péptidos derivados das nossas próprias proteínas celulares, poderemos interrogar-nos porque

é que as células CD8 do sistema imunitário não reconhecem e destroem os nossos próprios tecidos. Apesar da resposta a esta questão não ser totalmente clara, pensa-se, actualmente, que há dois mecanismos diferentes a operar. Primeiro, as células CD8 que podem reagir com péptidos próprios, são eliminadas no timo. Segundo, as células CD8 deixam de responder (tornam-se anérgicas) a péptidos próprios, nos órgãos periféricos do sistema imunitário. Uma vez que cada tipo possível, ou epítipo, de proteínas celulares não é sintetizado pelas células no timo, o segundo mecanismo parece ser a explicação mais plausível. Este mecanismo parece estar operacional para o nível de péptidos próprios normalmente encontrado. Se este nível aumentar, por alguns meios, pode demonstrar-se que os indivíduos têm, de facto, células CD8 que podem reconhecer e destruir células que expressam péptidos próprios. Esta última observação é significativa, relativamente ao conceito de utilizar o sistema imunitário para eliminar células de tumor.

SUMÁRIO BREVE DA INVENÇÃO

Uma abordagem mais directa para solucionar os problemas discutidos acima, seria estimular directa e especificamente, apenas as células CD8 que são relevantes para combater a doença. Conhecimentos recentes sobre o mecanismo que governa a carga de péptidos nas moléculas de Classe I, permitiu agora que isso fosse possível. Deste modo, as moléculas de Classe I têm sido expressas em células de *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta). Uma vez que a *Drosophila* não tem um sistema imunitário, as várias proteínas envolvidas na maquinaria de carga de péptidos deverão estar ausente destas células. É agora evidente que a ausência de uma maquinaria de carga de péptidos permite que as moléculas de Classe I sejam expressas como moléculas "vazias", na superfície da célula.

Uma outra vantagem de utilizar o sistema de *Drosophila* é que as células de *Drosophila* preferem uma temperatura de 28°C, em vez de 37°C. Este aspecto é muito importante, pois as moléculas de Classe I "vazias" são termolábeis e tendem a desintegrar-se a 37°C. Incubando as células de *Drosophila* que expressam Classe I, com péptidos que se podem ligar à molécula de Classe I, é possível conseguir que cada molécula de Classe I contenha um e o mesmo péptido. As células são, assim, muito

diferentes das células de mamífero, em que as moléculas de Classe I contêm muitos tipos diferentes de péptidos, a maioria dos quais derivam das nossas próprias proteínas celulares, inócuas.

Apesar dos esforços numerosos, infrutíferos, ao longo dos anos, em centenas de laboratórios, para activar especificamente células CD8 *in vitro*, parece razoável que um nível elevado de expressão de uma molécula de Classe I contendo um único péptido possa ultrapassar à necessidade de estimulação *in vivo* do sistema imunitário. Incubando as células de *Drosophila* tratadas de forma correcta, com células do baço ou nódulo linfático de ratinhos não estimulados (i.e., ratinhos que nunca estiveram antes em contacto com os péptidos utilizados), é agora possível gerar células T citotóxicas, que são totalmente específicas para o péptido antigénico. A resposta citotóxica é geralmente três a cinco vezes mais forte, do que a que se obtém através de métodos anteriormente conhecidos.

Apesar de alguns exemplos aqui descritos apresentarem um "modelo" que utiliza moléculas de Classe I de murídeo, descrevem-se aqui outros exemplos utilizando moléculas de Classe I humanas, ou ratinhos transgénicos que expressam moléculas humanas. Num exemplo, utiliza-se um péptido derivado da proteína gag de HIV (vírus de SIDA). Esta combinação de moléculas funciona bem; de facto, funciona tão bem quanto experiências que utilizam um modelo de murídeo puro. Além disso, o sistema presentemente descrito, que utiliza moléculas humanas num sistema de *Drosophila*, tal como presentemente descrito, é muito mais versátil do que o sistema de rato descrito num artigo recente de DeBruijn *et al.* (Eur. J. Immunol. 21:2963-70, 1991). Em particular, este último sistema requer uma quantidade enorme de células efectoras, de modo a matar, e é menos versátil do que o sistema presentemente descrito. De maior relevância, o sistema presentemente descrito, ao contrário do sistema de ratinho, utiliza eficazmente, e activa, respostas contra moléculas humanas.

A maioria das experiências presentemente descritas, realizadas até à data, utilizaram células de *Drosophila* intactas. No entanto, demonstra-se agora que as moléculas

truncadas, vazias, podem ser obtidas a partir de células de *Drosophila* com bons rendimentos (aproximadamente 1 mg/l). Estas moléculas poderão ser úteis para se conseguir a imunossupressão em pacientes de transplantes e para o tratamento de pacientes com doenças auto-imunes, como a artrite reumatóide.

Em resumo, a nossa dedicação de longo prazo, visando a compreensão dos pormenores de como os péptidos são produzidos e carregados em moléculas de Classe I *in vivo*, estimulou o desenvolvimento de um meio racional e altamente eficaz, pelo qual as células CD8 se podem tornar activadas contra péptidos da nossa escolha. Pensamos que a utilização destas células activadas pode ter um papel no tratamento de uma grande variedade de estados de doença.

Um meio racional, elaborado de produzir, carregar e utilizar moléculas de Classe I, para activar especificamente células CD8 *in vitro*, é agora descrito. Além disso, descrevem-se as aplicações terapêuticas desta nova tecnologia no tratamento do cancro, tumores e neoplasias, bem como doenças virais, retrovirais, auto-imunes e do tipo auto-imune.

A presente invenção proporciona um método para produzir células CD8 activadas *in vitro*, em que um método compreende colocar em contacto, *in vitro*, células CD8 com moléculas do MHC de Classe I humanas carregadas de antigénio expressas na superfície de células de insecto, durante um período de tempo suficiente para activar, de uma maneira específica do antigénio, as células CD8. Numa variação, as moléculas expressas na superfície são monotípicas; noutra, as moléculas expressas na superfície são mono-antigénicas. Os métodos aqui contemplados podem ainda compreender (a) a separação das células CD8 activadas das moléculas do MHC de Classe I carregadas de antigénio, (b) a suspensão das células CD8 activadas num transportador ou excipiente farmacologicamente aceitáveis. De acordo com os métodos revelados, os antigénios podem compreender proteínas ou polipéptidos nativos ou não degradados, ou podem compreender polipéptidos antigénicos que tenham sido clivados em fragmentos peptídicos compreendendo pelo menos 8 resíduos de aminoácido antes da incubação com as moléculas de Classe I humanas.

Uma célula T CD8 activada pelos métodos da invenção pode ser utilizada na preparação de um medicamento para o tratamento de um cancro, um tumor ou uma neoplasia, uma infecção viral (e.g., retroviral) ou uma condição auto-imune.

O medicamento pode ser adequado para administração por injeção intravenosa.

DESCRIÇÃO SUMÁRIA DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra um diagrama da construção dos plasmídeos de expressão pRmHa-2 e pRmHa-3. Na fig. 1A, mostra-se a construção pRmHa-2; Na Fig. 1B mostra-se a construção pRmHa-3; e na Fig. 1C, mostra-se o vector pRmHa-3, mostrando os locais de restrição, poliligante, promotor e poliadenilação, bem como um local em que uma sequência de nucleótidos pode ser inserida, para expressão.

A Figura 2A mostra que os MHC de Classe I de murídeo $K^b/\beta 2$ de ratinho (mB2) e $D^b/m\beta 2$ expressos em células de *Drosophila*, têm as características das moléculas de Classe I isentas de péptido, ou "vazias". As células de *Drosophila* que expressam $K^b/\beta 2$, $L^d/\beta 2$ e $D^b/\beta 2$ foram marcadas durante 45 minutos com 35S metionina e prepararam-se lisados. Cada lisado foi dividido em quatro alíquotas, às quais se adicionou, ou péptido OVA, ou NP, ou nenhum péptido. Após incubação durante uma hora a 4°C, o outro foi incubado durante uma hora a 30°C. As moléculas de Classe I foram então imunoprecipitadas a partir dos lisados e analisadas por SDS-PAGE. A Figura 2B mostra os resultados de um teste de lisados celulares radioactivos, preparados a partir de células de *Drosophila* que expressam $K^b/\beta 2$, $L^d/\beta 2$ e $D^b/\beta 2$, quer com microglobulina $\beta 2$ de murídeo, quer humana. A temperatura de incubação (em °C) é registada graficamente em função da cadeia pesada que pode ser imunoprecipitada (em %). Apresenta-se $K^b/m\beta 2$ (quadrados a branco), $K^b/m\beta 2$ + OVA-8 (quadrados a cheio), $L^d/m\beta 2$ (triângulos a branco), $L^d/m\beta 2$ + NP (triângulos a cheio) e $D^b/m\beta 2$ + INF (círculos a cheio).

A Figura 3 (A e B) mostra a fluorescência média de células de *Drosophila* transfectadas, cultivadas em meio isento

de soro, como determinado por citofluorometria, após coloração para $K^b/m\beta 2$, com anticorpo Y3 e de $D^b/m\beta 2$ com o anticorpo B22.249. Antes da coloração, e como indicado na Figura, as células foram incubadas em péptido (25 $\mu\text{g/ml}$), durante uma hora a 27°C, seguido de uma incubação de 2 horas, a 37°C. A fluorescência média de cada população de células tratada é representada graficamente em função das condições de incubação. A Figura 3A mostra que as moléculas de Classe I de ratinho, expressas na superfície de células de *Drosophila*, são rapidamente desnaturadas a 37°C, de modo que não podem mais ser reconhecidas por anticorpos anti-Classe I. A Figura 3B mostra que as moléculas de MHC de Classe I expressas em células de *Drosophila*, são termolábeis em lisados obtidos com Triton-X100, a menos que sejam previamente incubadas na presença de um péptido que se sabe que se liga especificamente à Classe I.

A Figura 4 mostra dados de uma experiência, concebida para determinar se as células de insecto podem processar o antigénio e carregá-lo nas moléculas de Classe I e se as últimas podem apresentar antigénios derivados quer endógena, quer exogenamente, a células T. Incubaram-se células Schneider 2 (SC2) ou 3T3 transfectadas com $K^b/m\beta 2$, com a proteína ovalbumina (OvPro) ou o péptido de ovalbumina OVA 24 (OvPep) em meio isotónico (Iso) ou Hipertónico (Hyp). (A linha celular de murídeo BALE/3T3, está disponível da ATCC com o número de concessão CCL 163). Após o tratamento, as células foram co-cultivadas com o hibridoma de células T B3/CD8. B3/CD8 é um hibridoma de células T entre B3 (Carbohe, *et al.*, J. Exp. Med. 169:603-12 (1989)), uma célula T citotóxica, específica para o péptido de ovalbumina 253-276 apresentado pelas moléculas de Classe I $H-2K^b$, e a linha celular que segrega IL-2, contendo CD8. Por estimulação antigénica, o B3/CD8 produz IL-2, medido por incorporação de ^3H -timidina numa linha celular dependente de IL-2, CTLL (Gillis *et al.*, J. Immunol. 120:2027 (1978)). Assim, medindo a quantidade de IL-2 produzida, pode-se testar o reconhecimento de células T.

Os sobrenadantes das co-culturas foram analisados quanto a IL-2, por incorporação de ^3H -timidina pela linha celular dependente de IL-2, CTLL (ATCC No. TIB 214). A quantidade de

³H-timidina incorporada é registada graficamente em função dos tratamentos celulares iniciais.

A Figura 5A mostra uma termoestabilização induzida por péptidos, de HLA B27 e HLA A2.1 expressos na superfície de células de *Drosophila*, por péptidos de HIV. A fluorescência média de cada população de células é representada graficamente em função das condições de incubação.

A Figura 5B mostra que o HLA B7 expresso em células de *Drosophila* tem as características de moléculas de Classe I vazias, em lisados obtidos com Triton X100.

A Figura 5C mostra que o HLA A2.2Y expresso em células de *Drosophila* tem as características de moléculas de Classe I vazias, em lisados obtidos com Triton X100.

A Figura 6 mostra a indução da resposta de CD8 primária, após a estimulação de CD8 *in vitro*, na presença ou ausência de péptido. As células que respondem são células de baço de ratinho B6 e os estimuladores são RMA-S (triângulos a branco); RMA-S mais OVA (triângulos a cheio); *Drosophila* mais OVA (quadrados a branco); e *Drosophila* K^b mais OVA (quadrados a cheio). Em 6A, o alvo são células RMA-S e o péptido de ovalbumina; em 6B, o alvo são células RMA-S. Em ambos os diagramas, a percentagem de lise é representada graficamente em função da razão efector/alvo.

A Figura 7 mostra a indução de resposta após estimulação de CD8 *in vitro*, com células de *Drosophila*, na presença ou ausência de péptido. Em 7, as células de baço de C57 B1/6 que respondem, são estimuladas com células de *Drosophila* K^b OVA. As células alvo incluem: EL4 (quadrados a branco com um ponto no centro); EL4 OVA (losango a branco); EL4 + péptido OVA (quadrados a negro com um ponto branco no centro); RMA-S + péptido OVA (losangos a negro com um ponto branco no centro) e RMA-S (quadrados a cheio). A percentagem de lise é representada graficamente em função da razão efector/alvo.

A Figura 8 (A e B) ilustra a estimulação *in vivo* com células de *Drosophila* transfectadas, em que os que respondem são células de baço de ratinho C57 B1/6. Em 8A, algumas das

células são fixadas; em 8B, as células de *Drosophila* são todas não fixadas. Em 8A, as células de mosca estimuladoras são como se segue: K^b (quadrados a branco com um ponto no centro); K^b OVA fixadas (losangos a cheio); K^b OVA fixadas + S/N (quadrado a negro com um ponto branco no centro); K^b OVA (não fixado) (losango a negro com um ponto branco no centro). Em 8B, as células de mosca estimuladoras são ilustradas como se segue: K^b (quadrados a branco com ponto no centro); K^b /OVA (losangos a cheio); K^b /OVA *in vivo*/ K^b /OVA *in vitro* (quadrados a cheio com um ponto branco no centro); K^b /OVA *in vivo*/ D^b /OVA *in vitro* (losangos a cheio com um ponto branco no centro); e D^b /OVA (quadrados a cheio). Em ambos, A e B, a percentagem de lise é representada graficamente em função da razão efector/alvo.

A Figura 9 mostra os resultados de uma experiência em que os ratinhos C57BL/6 foram injectados com 3MM de EL4 OVA e subsequentemente com células de *Drosophila*, ou sem células. A percentagem de sobrevivência de cada uma das três populações de ratinhos é representada graficamente em função do número de dias de sobrevivência. O grupo I (losangos a cheio), recebeu uma injeção subcutânea de 50MM de células de *Drosophila* vivas que expressam K^b /OVA, 5 dias após a injeção de EL4; o grupo II (quadrados a branco) recebeu 50MM de células de *Drosophila* fixadas, que expressam K^b /OVA, 5 dias após a injeção de EL4; e o grupo III (círculos a cheio), o grupo controlo, não recebeu injeções adicionais. Os ratinhos do grupo II foram sacrificados no dia 20; os ratinhos do grupo III, ao dia 23.

As Figuras 10A, B e C ilustram a activação *in vitro* com células de *Drosophila* transfectadas. Em ambas, A e B, as células que respondem são células de baço de ratinho transgénico B7/microglobulina $\beta 2$ humana. As células alvo são Jurkat (quadrados a branco com um ponto no centro) e Jurkat revestidas com péptido A de GAG de HIV (losangos a cheio), como ilustrado em ambas, A e B. Em 10A, as células estimuladoras são células de *Drosophila* com GAG de HIV de B7 (A); em 10B, são células de *Drosophila* com B7. Em 10C, as células que respondem são células de baço de ratinho transgénico B7, estimuladas por *Drosophila* B7 VPR. As células alvo são Jurkat (quadrados a branco com um ponto no centro); Jurkat/VPR (losangos a cheio); RMA-S (quadrados a branco); e RMA-S/VPR (losangos a branco com um ponto no centro). A

percentagem de lise é representada graficamente em função da razão efector/alvo, em A, B e C.

As Figuras 11A, B e C ilustram a activação *in vitro* com células de *Drosophila* transfectadas. Em 11A, as células que respondem são HLA B7 de PBL humanos, estimuladas com células de *Drosophila* B7 VPR. A percentagem de lise é representada graficamente em função da razão efector/alvo. As células alvo são Jurkat VPR (quadrados a branco com um ponto no centro); EL4 B7 (losango a cheio); Jurkat (quadrados a branco); e EL4 B7 VPR (losangos a branco com um ponto no centro). Em 11B, as células que respondem são HLA2 PBL humanos, estimuladas com células de *Drosophila* A2 GAG (A) (HIV). A percentagem de lise é representada graficamente em função da razão efector/alvo. As células alvo são Jurkat A2 (losangos a cheio) e Jurkat A2 GAG (A) (quadrados a branco com um ponto no centro). Em 11C, as células que respondem são B27 PBL humanos, estimulados com células de *Drosophila* B27 VPR (HIV). As células alvo são 310 B27 (quadrados a branco com um ponto no centro) ou 310 (B27) VPR (losangos a cheio). A percentagem de lise é representada graficamente em função da razão efector/alvo.

A Figura 12 ilustra a activação *in vitro* com células de *Drosophila* transfectadas. As células que respondem são PBL HAL A2.1 humanos estimuladas com células de *Drosophila* A2.1 revestidas com o péptido POL de HIV. A percentagem de lise é representada graficamente em função da razão efector/alvo. As células alvo são Jurkat A2.1 HIV (quadrados a branco com um ponto no centro) e Jurkat A2.1 (losangos a cheio).

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

A. Definições

Aminoácido: todos os resíduos de aminoácido aqui identificados estão na configuração L natural. Mantendo a nomenclatura de polipéptidos convencional, J. Biol. Chem., 243:3557-59 (1969), as abreviaturas para os resíduos de aminoácidos são como se mostra na seguinte tabela de correspondência:

TABELA DE CORRESPONDÊNCIA
SÍMBOLO AMINOÁCIDO

SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
1 letra	3 letras	
Y	Tyr	L-tirosina
G	Gly	glicina
F	Phe	L-fenilalanina
M	Met	L-metionina
A	Ala	L-alanina
S	Ser	L-serina
I	Ile	L-isoleucina
L	Leu	L-leucina
T	Thr	L-treonina
V	Val	L-valina
P	Pro	L-prolina
K	Lys	L-lisina
H	His	L-histidina
Q	Gln	L-glutamina
E	Glu	L-ácido glutâmico
W	Trp	L-triptofano
R	Arg	L-arginina
D	Asp	L-ácido aspártico
N	Asn	L-asparagina
C	Cys	L-cisteína

Deve ter-se em conta que todos as sequências de resíduos de aminoácidos são aqui representadas por fórmulas, cuja orientação da esquerda para a direita está na direcção convencional, do terminal amino para o terminal carboxilo.

Par de bases (pb) : é uma parceria entre a adenina(A) e a timina (T) ou entre a citosina (C) e a guanina (G), numa hélice dupla de ADN.

Clone: descreve um grande número de células ou moléculas idênticas a uma única célula ou molécula ancestral.

Bases complementares: nucleótidos que normalmente emparelham quando o ADN ou ARN adopta uma configuração de cadeia dupla.

Sequência de nucleótidos complementar: sequência de nucleótidos numa molécula de ADN ou ARN de cadeia simples, que é suficientemente complementar à sequência noutra cadeia simples, para hibridar especificamente com ela, com formação consequente de ligações por hidrogénio.

Conservado: uma sequência nucleotídica é conservada em relação a uma sequência pré-seleccionada (referência), se não hibrida ao acaso com um complemento exacto da sequência pré-seleccionada.

Jusante: identifica sequências que prosseguem mais longe na direcção da expressão; por exemplo, a região de um gene que codifica para o polipéptido, está a jusante do codão de iniciação.

Expressão: processo sofrido por um gene estrutural, para produzir um polipéptido. É uma combinação de transcrição e tradução.

Gene (cistrão): ácido nucleico cuja sequência de nucleótidos codifica para um ARN ou um polipéptido. Um gene pode ser ou de ARN ou ADN. Pode também incluir regiões que antecedem e sucedem à região codificante ("leader" e "trailer"), bem como sequências intervenientes (intrões) entre segmentos codificantes individuais (exões).

Hibridação: emparelhamento de sequências nucleotídicas substancialmente complementares (cadeias de ácido nucleico), para formar uma dúplex ou heterodúplex, por estabelecimento de ligações de hidrogénio entre pares de bases complementares. É uma interacção específica, i.e. não ao acaso, entre dois polinucleótidos complementares, que podem ser inibidos de forma competitiva.

Ligando: Ligando refere-se a uma molécula que contém uma porção estrutural que é ligada por uma interacção específica com uma proteína receptora particular.

Nucleótido: unidade monomérica de ADN ou ARN consistindo de uma porção de glicido (pentose), um grupo fosfato, e uma base heterocíclica azotada. A base está ligada à porção de

glicido através do carbono glicosídico (carbono 1' da pentose) e essa combinação de base e glicido é um nucleósido. Quando o nucleósido contém um grupo fosfato ligado na posição 3' ou 5' da pentose, é designado por nucleótido. Uma sequência de nucleótidos ligados de forma operacional é tipicamente aqui designada por "sequência de bases" ou "sequência nucleotídica" e seus equivalentes gramaticais, e é aqui representada por uma fórmula, cuja orientação da esquerda para a direita é na direcção convencional do terminal-5' para o terminal-3'.

Oligonucleótido ou polinucleótido: polímero de nucleótidos, de cadeia simples ou dupla. Tal como aqui utilizado, o termo "oligonucleótido" e os seus equivalentes gramaticais, incluirá a totalidade dos ácidos nucleicos. Um oligonucleótido referir-se-á tipicamente a uma molécula de ácidos nucleicos constituída por uma cadeia linear de ribonucleótidos. O tamanho exacto dependerá de muitos factores, que por sua vez dependem das condições finais de utilização, como é bem conhecido na arte.

Sequência de leitura aberta: sequência nucleotídica, normalmente uma sequência de ADN, que pode ser (potencialmente) traduzida numa proteína.

Polipéptido e péptido: são termos utilizados aqui de forma interpermutável, para designar uma série linear de resíduos de aminoácidos, ligados uns aos outros por ligações peptídicas entre os grupos alfa-amino e carboxilo de resíduos adjacentes.

Receptor: receptor e proteína receptora são termos utilizados aqui para indicar uma molécula proteica biologicamente activa, que se liga especificamente a (ou com) outras moléculas.

Molécula de ADN recombinante (ADNr): molécula de ADN produzida ligando de forma operacional uma sequência de ácidos nucleicos, tal como um gene, a uma sequência de molécula de ADN da presente invenção. Assim, uma molécula de ADN recombinante é uma molécula de ADN híbrida, que compreende pelo menos duas sequências de nucleótidos que não se encontram normalmente juntas na natureza. Os ADNr que não têm uma origem

biológica comum, i.e. que são evolutivamente distintos, são ditos “heterólogos”.

Substancialmente homólogo: significa que uma dada sequência ou molécula particular, por exemplo uma sequência mutante, varia em relação a uma sequência referência em uma ou mais substituições, deleções ou adições, sendo que o efeito global não resulta numa dissimilitude funcional adversa, entre as sequências referência e a particular. Para fins da presente invenção, as sequências de aminoácidos que têm mais de 90 por cento de semelhança, actividade biológica equivalente e características de expressão equivalentes, são consideradas substancialmente homólogas. As sequências de aminoácidos com mais de 40 por cento de semelhança são consideradas substancialmente semelhantes. Para fins de determinação da homologia ou semelhança, devem desprezar-se as deleções de truncação ou internas da sequência referência, tal como o devem as modificações subsequentes da molécula, e.g. glicosilação. As sequências que têm menores graus de homologia e bioactividade comparável são consideradas equivalentes.

Transfecção: é a aquisição de novos marcadores genéticos, por incorporação de ADN adicionado em células eucarióticas.

Vector: ácido nucleico, de preferência uma molécula de ADN, capaz de replicação autónoma numa célula e ao qual um segmento de ácido nucleico, e.g. um gene ou polinucleótido (de preferência ADN), pode ser ligado de forma operacional, de modo a efectuar a replicação do segmento ligado. Os vectores capazes de direccionar a expressão de segmentos (genes) de ácido nucleico (de preferência ADN) que codificam para uma ou mais proteínas, são aqui designados por “vectores de expressão”. Uma outra variedade de vectores importantes permite a clonagem de ADNc (ADN complementar) a partir de ARNm produzidos utilizando transcriptase inversa.

Vector de clonagem: é qualquer plasmídeo ou vírus, no qual uma sequência nucleotídica estranha (de preferência de ADN) pode ser inserida, para ser clonada.

Vector de expressão: é qualquer plasmídeo ou vírus, no qual uma sequência nucleotídica estranha (de preferência de ADN) pode ser inserida, para ser expressa.

B. Descrição pormenorizada

1. Moléculas de MHC de Classe I humanas

Uma molécula de MHC de Classe I humana para utilização na presente invenção pode ser seleccionada de entre o grupo compreendendo HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F e HLA-G e mais preferencialmente, do grupo compreendendo HLA-A, HLA-B e HLA-C.

Apesar de ser possível isolar sequências nucleotídicas que codificam para moléculas de MHC de Classe I humanas, a partir de linhas celulares estabelecidas, conhecidas, portadoras das variantes adequadas - e.g. linhas celulares transformadas JY, BM92, WIN, MOC e MG - é mais prático sintetizar a sequência nucleotídica a partir de uma porção do gene, através de uma reacção em cadeia com polimerase (PCR), utilizando os iniciadores adequados. Este método tem sido utilizado com sucesso para clonar ADNc de HLA de comprimento total; por exemplo, as sequências para HLA-A25, HLA-A2, HLA-B7, HLA-B57, HLA-B51 e HLA-B37 estão depositadas na base de dados da GenBank com os números de acesso M32321, M32322, M32317, M32318, M32319 e M32320, respectivamente. Estão publicadas sequências de aminoácidos e de nucleótidos de HLA, parciais e putativas, conhecidas, incluindo a sequência de consenso (veja-se e.g. Zemmour e Parham, Immunogenetics 33:310-320 (1991)) e são conhecidas linhas celulares que expressam variantes de HLA, que estão também geralmente disponíveis, muitas da American Type Culture Collection ("ATCC"). Assim, utilizando PCR, é possível sintetizar sequências de nucleótidos que codificam para MHC de Classe I humanas, que poderão então ser ligadas de forma operacional a um vector e utilizadas para transformar uma célula adequada e ser expressas nesta.

Os métodos particularmente preferidos para produzir moléculas de MHC de Classe I humanas e moléculas de microglobulina $\beta 2$ humanas, baseiam-se na utilização de

oligonucleótidos pré-selecionados como iniciadores, numa reacção em cadeia com polimerase (PCR), para formar produtos de reacção de PCR, como aqui descrito. A preparação do gene de MHC e de microglobulina $\beta 2$ é tipicamente realizada por extensão dos iniciadores, de preferência por extensão de iniciadores num formato de reacção em cadeia com polimerase (PCR).

Quando se pretende produzir os genes por amplificação (por PCR), devem utilizar-se dois iniciadores, i.e. um par de iniciadores de PCR, para cada cadeia de ácidos nucleicos codificante a ser amplificada. (Para fins de simplicidade, será discutida a síntese de um exemplo da sequência variante de HLA, mas deve entender-se expressamente que o método de amplificação por PCR descrito é igualmente aplicável à síntese de microglobulina $\beta 2$ e de todas as variantes de HLA, incluindo aquelas cujas sequências completas são presentemente desconhecidas). O primeiro iniciador torna-se parte da cadeia de sentido inverso (menos ou complementar) e hibrida com uma sequência de nucleótidos conservada entre as cadeias de HLA (mais ou codificante). Para produzir homólogos de ADN codificantes, primeiro os iniciadores são escolhidos para hibridar com (i.e. ser complementares a) regiões conservadas dentro dos genes de MHC, de preferência a sequência de consenso, ou regiões conservadas semelhantes, dentro de cada grupo de HLA - i.e. sequências de consenso dentro de HLA-A, HLA-B, HLA-C e os grupos menos polimórficos HLA-E, -F e -G. Os segundos iniciadores tornam-se parte da cadeia codificante (mais) e hibridam com uma sequência nucleotídica conservada entre as cadeias menos. Para produzir os homólogos de ADN codificantes para HLA, os segundos iniciadores são assim escolhidos para hibridar com uma sequência de nucleótidos conservada, na extremidade 5' do gene que codifica para HLA, tal como na área que codifica para a região "leader" ou primeira sequência. Deve ter-se em conta que na amplificação dos homólogos de ADN codificantes, a sequência nucleotídica 5' conservada do segundo iniciador, pode ser complementar a uma sequência adicionada exogenamente utilizando desoxinucleotidiltransferase terminal, como descrito por Loh *et al.*, Science 243:217-220 (1989). Um, ou ambos, o primeiro e segundo iniciadores podem conter uma sequência nucleotídica que define um local de reconhecimento de endonuclease. O local

pode ser heterólogo em relação ao gene de imunoglobulina que está a ser amplificado e aparece tipicamente na, ou próximo da extremidade 5' do iniciador.

O primeiro iniciador de um par de iniciadores de PCR é por vezes referido como "iniciador de sentido directo", pois hibrida com a cadeia codificante, ou de sentido directo, de um ácido nucleico. Adicionalmente, o segundo iniciador de um par de iniciadores de PCR é por vezes aqui designado por "iniciador de sentido inverso", pois hibrida com uma cadeia não codificante, ou de sentido inverso, de um ácido nucleico, i.e. uma cadeia complementar a uma cadeia codificante. Pode-se utilizar uma pluralidade de primeiros iniciadores e/ou uma pluralidade de segundos iniciadores, em cada amplificação, e.g. uma espécie do primeiro iniciador pode ser emparelhada com um número de segundos iniciadores diferentes, para formar vários pares de iniciadores diferentes. Alternativamente, pode-se utilizar um par individual do primeiro e segundo iniciadores. Em qualquer caso, os produtos de amplificação, de amplificações que utilizam a mesma, ou combinações diferentes do primeiro e segundo iniciadores, podem ser combinados para aumentar a diversidade da biblioteca de genes.

Quando presente, a porção que define o local de restrição está tipicamente localizada numa porção de terminal-5' do iniciador não utilizada na iniciação de síntese. O local de restrição definido pelo primeiro iniciador é tipicamente escolhido, de modo a ser reconhecido por uma enzima de restrição que não reconhece o local de restrição definido pelo segundo local de restrição, definido pelo segundo iniciador, sendo o objectivo ser capaz de produzir uma molécula de ADN com terminais coesivos, que são não complementares um em relação ao outro e permitem, assim, a inserção direccionada num vector.

Numa concretização, a presente invenção utiliza um conjunto de polinucleótidos que formam iniciadores, com uma região de iniciação de síntese localizada no terminal-3' do iniciador. A região de iniciação de síntese consiste tipicamente das 15 a 30 bases de nucleótidos mais próximos de 3' (terminal-3'). A porção de iniciação de síntese do terminal-3' de cada iniciador, é capaz de actuar como um

iniciador para catalisar a síntese de ácidos nucleicos, i.e. iniciar uma reacção de extensão de iniciadores do seu terminal-3'. Um, ou ambos os iniciadores podem conter adicionalmente uma porção não iniciadora de terminal-5' (mais próximo de 5'), i.e., uma região que não participa na hibridação com o molde de HLA.

Em PCR, cada iniciador funciona em combinação com um segundo iniciador, para amplificar uma sequência de ácidos nucleicos alvo. A escolha dos pares de iniciadores para utilização em PCR rege-se por considerações, como aqui discutido para produzir moléculas de MHC de Classe I e microglobulina $\beta 2$, humanas. Isto é, os iniciadores têm uma sequência nucleotídica que é complementar à sequência conservada no gene de escolha. Sequências de iniciação de síntese úteis são descritas a seguir.

A estratégia utilizada para clonagem dos genes de HLA irá depender, como é bem conhecido na arte, do tipo, complexidade e pureza dos ácidos nucleicos que constituem os vários genes de HLA. Outros factores incluem o facto de os genes serem ou não para ser amplificados e/ou mutados.

Em geral, os genes de HLA compreendem cadeias que codificam para polinucleótidos, tais como ARNm e/ou a cadeia de sentido directo de ADN genómico. Se o HLA está na forma de ADN genómico de cadeia dupla, este é normalmente desnaturado primeiro, tipicamente por fusão, em cadeias simples. Uma sequência de HLA é submetida a uma reacção PCR, tratando (contactando) a sequência com um par de iniciadores de PCR, em que cada membro do par tem uma sequência nucleotídica pré-seleccionada. O par de iniciadores de PCR é capaz de iniciar reacções de extensão de iniciadores, por hibridação com sequências nucleotídicas, de preferência de pelo menos cerca de 10 nucleótidos de comprimento e, mais preferencialmente, de pelo menos cerca de 20 nucleótidos de comprimento, conservados na sequência de HLA.

A reacção de PCR é realizada misturando o par de iniciadores de PCR, de preferência uma sua quantidade predeterminada, com os ácidos nucleicos do gene de HLA, de preferência, uma sua quantidade predeterminada, num tampão de

PCR, para formar uma mistura de reacção de PCR. A mistura é mantida sob condições de síntese de polinucleótidos, durante um período de tempo, que é tipicamente predeterminado, suficiente para a formação de um produto de reacção de PCR, produzindo desse modo uma pluralidade de homólogos de ADN que codificam para HLA, diferentes.

Noutra estratégia, o objectivo é clonar os genes que codificam para a variante de HLA, a partir de uma variante de HLA, proporcionando um complemento de polinucleótidos do HLA, tal como a cadeia de sentido inverso de ADNdc genómico, ou o polinucleótido produzido submetendo o ARNm a uma reacção de transcriptase inversa. Métodos para produzir estes complementos são bem conhecidos na arte.

A reacção de PCR é realizada utilizando qualquer método adequado. Em geral, ocorre numa solução aquosa tamponada, i.e. um tampão de PCR, de preferência a um pH de 7-9, mais preferencialmente de cerca de 8. De preferência, mistura-se um excesso molar (para ácido nucleico genómico, geralmente cerca de $10^6:1$ de iniciador:molde) do iniciador, no tampão que contém a cadeia molde. Prefere-se um excesso molar elevado, para melhorar a eficácia do processo.

O tampão de PCR também contém, preferencialmente, os trifosfatos de desoxirribonucleótido dATP, dCTP, dGTP e dTTP e uma polimerase, tipicamente termoestável, todos em quantidades adequadas para a reacção de extensão do iniciador (síntese de polinucleótidos). A solução resultante (mistura de PCR) é aquecida a cerca de 90°C - 100°C , durante cerca de 1 a 10 minutos, de preferência de 1 a 4 minutos. Após este período de aquecimento, a solução é deixada a arrefecer a 54°C , o que é preferido para a hibridação de iniciadores. A reacção de síntese pode ocorrer desde a temperatura ambiente até a uma temperatura acima da qual a polimerase (agente indutor) já não funciona eficazmente. Assim, por exemplo, se a polimerase de ADN é utilizada como agente indutor, a temperatura não é geralmente superior a cerca de 40°C . Um exemplo de tampão de PCR compreende o seguinte: KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; pH 8,3; MgCl₂ 1,5 mM; gelatina a 0,001% (p/v), dATP 200 μM ; dTTP 200 μM ; dCTP 200 μM ; dGTP 200 μM ; e 2,5 unidades de polimerase I

de ADN de *Thermus aquaticus* (Patente U.S. No. 4889818) por 100 microlitros de tampão.

O agente indutor pode ser qualquer composto ou sistema, que irá funcionar para realizar a síntese dos produtos de extensão do iniciador, incluindo enzimas. Enzimas adequadas para este fim incluem, por exemplo, polimerase I de ADN de *E. coli*, fragmento Klenow da polimerase I de ADN de *E. coli*, polimerase de ADN de T4, outras polimerases de ADN disponíveis, transcriptase inversa, e outras enzimas, incluindo enzimas estáveis ao calor, que irão facilitar a combinação dos nucleótidos, do modo adequado para formar os produtos de extensão do iniciador, que são complementares a cada cadeia de ácido nucleico. Em geral, a síntese será iniciada na extremidade 3' de cada iniciador e prossegue na direcção 5', ao longo da cadeia molde, até a síntese terminar, produzindo moléculas de diferentes tamanhos. Poderão haver agentes indutores, no entanto, que iniciam a síntese na extremidade 5' e prosseguem na direcção acima, utilizando o mesmo processo que o descrito acima.

O agente indutor pode ser também um composto ou sistema que irá funcionar para realizar a síntese dos produtos de extensão do iniciador de ARN, incluindo enzimas. Em concretizações preferidas, o agente indutor pode ser uma polimerase de ARN dependente de ADN, tal como a polimerase de ARN de T7, polimerase de ARN de T3 ou polimerase de ARN de SP6. Estas polimerases produzem um polinucleótido de ARN complementar. A elevada taxa de "turnover" da polimerase de ARN, amplifica o polinucleótido de partida, como foi descrito por Chamberlin *et al.*, *The Enzymes*, ed. P. Boyer, PP. 87-108, Academic Press, Nova Iorque (1982). Uma outra vantagem da polimerase de ARN de T7 é que se podem introduzir mutações na síntese do polinucleótido, substituindo uma porção do ADNc por um ou mais oligodesoxinucleótidos mutagénicos (polinucleótidos) e transcrevendo o molde parcialmente desemparelhado, directamente, como anteriormente descrito por Joyce *et al.*, *Nuc. Acid Res* 17:711-722 (1989). Os sistemas de amplificação baseados na transcrição foram descritos por Gingeras *et al.* in *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, pp 245-253, Academic Press, Inc., San Diego, CA (1990).

Se o agente indutor é uma polimerase de ARN dependente de ADN e, portanto, incorpora trifosfatos de ribonucleótido, misturam-se quantidades suficientes de ATP, CTP, GTP e UTP na mistura reaccional de extensão de iniciadores e a solução resultante é tratada como acima descrito.

A cadeia sintetizada de novo e a sua cadeia de ácidos nucleicos complementar formam uma molécula de cadeia dupla, que pode ser utilizada nos passos subsequentes do processo.

Após produzir os homólogos de ADN que codificam para variantes de HLA para um ou vários genes diferentes no sistema de HLA, as moléculas de ADN são, tipicamente, posteriormente amplificadas. Apesar de as moléculas de ADN poderem ser amplificadas por técnicas clássicas, como incorporação num vector de replicação autónoma, é preferível amplificar primeiro as moléculas, submetendo-as a uma reacção em cadeia com polimerase (PCR), antes de as inserir num vector. A PCR é tipicamente realizada por ciclos térmicos, i.e. aumentando e diminuindo repetidamente a temperatura de uma mistura reaccional de PCR, numa gama de temperaturas cujo limite inferior é de cerca de 10°C a 40°C e cujo limite superior é de cerca de 90°C a cerca de 100°C. O aumento e diminuição podem ser contínuos, mas são de preferência por fases, com períodos de tempo de estabilidade da temperatura relativa, a cada uma das temperaturas, favorecendo a síntese de polinucleótidos, desnaturação e hibridação.

Os métodos de amplificação por PCR estão descritos em pormenor nas Patentes U.S. Nos. 4683192, 4683202, 4800159 e 4965188 e pelo menos nalguns textos, incluindo "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", H. Erlich, ed., Stockton Press, Nova Iorque (1989); e "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Innis *et al.*, eds., Academic Press, San Diego, Califórnia (1990). Vários métodos e iniciadores preferidos, aqui utilizados, estão descritos a seguir e estão também descritos em Nilsson *et al.*, Cell 58:707 (1989), Ennis *et al.*, PNAS USA 87:2833-7 (1990), e Zemmour *et al.*, Immunogenetics 33:310-20 (1991), por exemplo. Em particular, é preferido conceber iniciadores a partir da comparação entre regiões 5' e 3' não traduzidas de alelos de HLA (e.g., alelos -A, -B, -C, -E, -F e -G), com selecção de sequências conservadas. Também se podem incorporar locais de restrição nos iniciadores 5' e

3', para permitir que os produtos de amplificação sejam subclonados em vetores de sequenciação ou expressão. Poderá também ser útil colocar uma sequência espaçadora de 4 bases, próxima do local de restrição, para melhorar a eficácia do corte dos produtos de amplificação com enzimas.

Os iniciadores seguintes são preferidos para amplificação de ADNc de HLA-A, -B, -C, -E, -F e -G, de preferência em reacções separadas. Os ADNc resultantes podem então ser clonados e sequenciados como aqui descrito. Estes iniciadores são adequados para utilização na amplificação de todos os tipos de HLA conhecidos e presentemente desconhecidos.

HLA A

Iniciador 5': .5' CC ACC ATG GCC GTC ATG GCG CCC 3'

(SEQ ID NO 1)

Iniciador 3': 5' GG TCA CAC TTT ACA AGC TCT GAG 3'

(SEQ ID NO 2)

HLA B

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

(SEQ ID NO 3)

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

(SEQ ID NO 4)

HLA C

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

(SEQ ID NO 5)

Iniciador 3': 5' GG TCA GGC TTT ACA AGC GAT GAG 3'

(SEQ ID NO 6)

HLA E

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

(SEQ ID NO 7)

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

(SEQ ID NO 8)

HLA F

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

(SEQ ID NO 9)

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

(SEQ IO NO 10)

HLA G

Iniciador 5': 5' CC ACC ATG GCG CCC CGA ACC CTC 3'
(SEQ ID NO 11)

Iniciador 3': 5' GG TCA CAA TTT ACA AGC CGA GAG 3'
(SEQ ID NO 12)

Em concretizações preferidas, apenas um par do primeiro e segundo iniciadores é utilizado para a reacção de amplificação. Os produtos da reacção de amplificação obtidos a partir de várias amplificações diferentes, cada uma utilizando vários pares de iniciadores diferentes, são então combinados. No entanto, a presente invenção também contempla a produção de homólogos de ADN, através de co-amplificação (utilizando dois pares de iniciadores) e amplificação múltipla (utilizando até cerca de 8, 9 ou 10 pares de iniciadores).

O processo de PCR pode ser utilizado não só para produzir uma variedade de moléculas de ADN que codificam para Classe I humanas, mas também para induzir mutações que podem emular as observadas nos *loci* de HLA, altamente polimórficos, ou para criar diversidade a partir de um único clone progenitor, proporcionando assim uma "biblioteca" de ADN que codifica para moléculas de MHC de Classe I, com uma maior heterogeneidade. Primeiro, deve notar-se que o próprio processo de PCR é inerentemente mutagénico, devido a uma variedade de factores bem conhecidos na arte. Segundo, além das variações que induzem mutação, descritas na patente U.S N°. 4683195 referida acima, podem-se utilizar outras variações de PCR indutoras de mutações. Por exemplo, a mistura reaccional de PCR pode ser efectuada com diferentes quantidades de um ou mais dos nucleótidos a incorporar no produto de extensão. Nestas condições, a reacção de PCR prossegue para produzir substituições de nucleótidos dentro do produto de extensão, como resultado da escassez de uma base particular. De modo semelhante, podem-se incorporar quantidades aproximadamente equimolares de nucleótidos na mistura reaccional de PCR inicial, numa quantidade que realize eficientemente X número de ciclos e em seguida submeter a mistura a um número de ciclos superior em relação a X, tal como, por exemplo, 2X. Alternativamente, podem-se induzir mutações durante a reacção de PCR, incorporando na mistura reaccional derivados de nucleótidos como a inosina, que não se encontram normalmente

nos ácidos nucleicos da variante de HLA a amplificar. Durante a amplificação subsequente *in vivo*, o derivado de nucleótido será substituído por um nucleótido substituto, induzindo desse modo uma mutação pontual.

Um método preferido que pode ser utilizado para clonar uma sequência de nucleótidos que pode ser expressa, que codifica para MHC de Classe I, humana, é como se segue. As células que contêm um(os) gene(s) de escolha podem ser crescidas num meio adequado (e.g. RPMI 1640), suplementado como necessário (e.g. com soro fetal de vitela e/ou antibióticos). O ARN celular total é preparado a partir da cultura de escolha e o ADNc da primeira cadeia é então sintetizado. O ADNc pode ser sintetizado utilizando, por exemplo, oligo(dT) e transcriptase inversa do vírus de mieloblastose de ave. A marcação radioactiva pode também ser utilizada para auxiliar no isolamento e recuperação do produto clonado. O produto é então preferencialmente extraído, precipitado e utilizado como alvo para amplificação por PCR, utilizando o par de iniciadores de PCR adequado, como aqui descrito. A amplificação pode ser realizada utilizando métodos e kits disponíveis, e.g. kits GeneAmp e um aparelho de ciclos térmicos de ADN (Perkin-Elmer/Cetus). Vários protocolos são também úteis; um protocolo de amplificação faz 30 ciclos, em que cada ciclo consiste de 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 65°C e 90 segundos a 72°C, seguido de 10 minutos a 72°C. Um outro protocolo faz 20 ciclos com 60 segundos a 94°C, um segundo a 65°C e um tempo variável a 72°C, que começa a cerca de 50 segundos e aumenta com incrementos de um segundo em cada ciclo. A amplificação termina então com 10 minutos a 72°C.

Tipicamente, o produto de PCR é então subclonado e sequenciado de acordo com métodos conhecidos. Por exemplo, o produto pode ser extraído e extraído de volta (e.g. com fenol/clorofórmio), precipitado, e digerido com uma enzima adequada - e.g. Hind III - durante um intervalo de tempo adequado. O produto de corte duplo é isolado e purificado (por exemplo, com pérolas de vidro) e ligado a vectores cortados de forma semelhante. Selecciona-se então um vector adequado, com base nas características da linha celular seleccionada para expressar a molécula de MHC. Por exemplo, pode-se expressar o MHC em *E. coli* para fins de recuperação do MHC para análise de

sequenciação. Alternativamente, pode-se expressar o MHC numa linha celular transformada, com o fim de activar células CD8. A selecção de vectores adequados é então discutida em maior pormenor, mais à frente nesta secção.

2. Vectores de expressão de ADN

Um vector da presente invenção é uma molécula de ácido nucleico (de preferência ADN) capaz de replicação autónoma numa célula e à qual um segmento de ADN, e.g. um gene ou polinucleótido, pode ser ligado de forma operacional, de modo a se obter a replicação do segmento ligado. Na presente invenção, um dos segmentos de nucleótido a ligar de forma operacional às sequências de vector, codifica para pelo menos uma porção de uma molécula de MHC de Classe I de mamífero. De preferência, toda a sequência que codifica para o péptido do gene de MHC está inserida no vector e é expressa; no entanto, também é possível construir um vector que também inclui algumas sequências de MHC não codificantes. De preferência, as sequências não codificantes do MHC são excluídas. Um outro vector preferido inclui uma sequência de nucleótidos que codifica para pelo menos uma porção de uma molécula de microglobulina $\beta 2$ de mamífero, ligada de forma operacional ao vector, para expressão. Também é possível construir um vector que inclui sequências nucleotídicas que codificam ambas, uma molécula de MHC de Classe I e uma microglobulina $\beta 2$.

Um vector preferido, compreende uma cassette que inclui uma ou mais sequências de ADN que podem ser traduzidas, ligadas de forma operacional para expressão, através de uma sequência de nucleótidos, adaptada para ligação direcciona. A cassette inclui preferencialmente sequências de controlo de expressão de ADN, para expressar o polipéptido ou proteína que é produzido quando uma sequência de ADN que pode ser traduzida é inserida direccionalmente na cassette, através de uma sequência de nucleótidos adaptada para ligação direcciona. A cassette também inclui preferencialmente uma sequência de promotor, a montante da sequência de ADN que pode ser traduzida e uma sequência de poliadenilação, a jusante da sequência de MHC de mamífero. A cassette pode também incluir um marcador para selecção, embora seja preferido que esse

marcador seja codificado numa sequência nucleotídica ligada de forma operacional a outra sequência do vector de expressão.

Um vector de expressão caracteriza-se por ser capaz de expressar, num hospedeiro compatível, um produto de um gene estrutural, tal como um polipéptido de MHC de Classe I humano, uma microglobulina β_2 , ou ambos.

Tal como aqui utilizado, o termo "vector" refere-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar entre diferentes ambientes genéticos, outro ácido nucleico, ao qual foi ligado de forma operacional. Os vectores preferidos são aqueles capazes de replicação e expressão autónoma dos produtos dos genes estruturais, presentes nos segmentos de nucleótidos (ADN) aos quais estão ligados de forma operacional.

Tal como aqui utilizada em relação a sequências ou segmentos de ADN, a frase "ligado de forma operacional" significa que as sequências ou segmentos foram ligadas de forma covalente numa porção de ADN, quer na forma de cadeia simples, quer dupla.

A escolha do vector ao qual a cassette da invenção é ligada de forma operacional, depende directamente, como é bem conhecido na arte, das propriedades funcionais desejadas, e.g. replicação do vector e expressão da proteína e da célula hospedeira a transformar, sendo estas limitações inerentes à arte de construir moléculas de ADN recombinantes.

Em várias concretizações, utiliza-se um vector para a produção de polipéptidos úteis nos métodos da presente invenção, incluindo variantes de MHC e péptidos antigénicos. Estes vectores são preferencialmente utilizados em conjunto com células "hospedeiras" bacterianas, adaptadas para a produção de quantidades úteis de proteínas ou polipéptidos. Estes vectores podem incluir um replicação procariótico, i.e. uma sequência nucleotídica com a capacidade de replicação autónoma directa e manutenção da molécula de ADN recombinante extra-cromossomicamente, numa célula hospedeira procariótica, tal como uma célula hospedeira bacteriana, transformada com ela. Estes replicões são bem conhecidos na arte. Além disso,

as concretizações que incluem um replicação procariótico, podem também incluir um gene cuja expressão confere uma vantagem selectiva, tal como resistência a drogas, a um hospedeiro bacteriano transformado com ele. Os genes de resistência a drogas, bacterianos, típicos, são os que conferem resistência à ampicilina ou à tetraciclina. Os vectores também contêm tipicamente locais de restrição convenientes, para inserção de sequências de nucleótidos que podem ser traduzidas. Exemplos de vectores incluem os plasmídeos pUC8, pUC9, pUC18, pBR322 e pBR329, disponíveis da BioRad Laboratories (Richmond, CA), pPL e pKK223, disponíveis da Pharmacia (Piscataway, NJ) e pBS e M13mp19 (Stratagene, La Jolla, CA). Outros exemplos de vectores incluem pCMU (Nilsson *et al.*, Cell 58:707 (1989)). Também se podem sintetizar outros vectores adequados, de acordo com métodos conhecidos; por exemplo, os vectores pCMU/K^b e pCMUII aqui utilizados em várias aplicações, são modificações de pCMUIV (Nilsson *et al.*, *supra*).

Uma sequência de nucleótidos adaptada para ligação direccionada, i.e. um poliligante, é uma região do vector de expressão que (1) liga de forma operacional, para replicação e transporte, as sequências nucleotídicas a montante e a jusante e (2) proporciona um local ou meio para a ligação direccionada de uma sequência de nucleótidos num vector. Tipicamente, um poliligante direccionado é uma sequência de nucleótidos que define duas ou mais sequências de reconhecimento de endonucleases de restrição, ou locais de restrição. Por clivagem de restrição, os dois locais resultam em terminais coesivos, nos quais se pode ligar uma sequência de nucleótidos que pode ser traduzida, ao vector de expressão. De preferência, os dois locais de restrição proporcionam, por clivagem com enzimas de restrição, terminais coesivos que são não complementares e permitem, assim, a inserção direccionada de uma sequência nucleotídica que pode ser traduzida, numa cassette. Numa concretização, o meio de ligação direccionada é proporcionado pelos nucleótidos presentes na sequência de nucleótidos a montante, sequência de nucleótidos a jusante, ou ambas. Noutra concretização, a sequência de nucleótidos adaptada para ligação direccionada compreende uma sequência de nucleótidos que define meios de clonagem direccionada, múltiplos. Quando a sequência de nucleótidos adaptada para

ligação direccional define numerosos locais de restrição, ela é designada por local de clonagem múltiplo.

Uma sequência de nucleótidos que pode ser traduzida, é uma série linear de nucleótidos que proporciona uma série ininterrupta de pelo menos 8 codões, que codificam para um polipéptido numa sequência de leitura. De preferência, a sequência de nucleótidos é uma sequência de ADN. Adicionalmente, há preferencialmente uma sequência a montante da sequência de nucleótidos que pode ser traduzida, que codifica para uma sequência promotora. De preferência, o promotor é condicional (e.g. indutível). Um promotor condicional preferido aqui utilizado é um promotor de metalotioneína ou um promotor de choque térmico.

Os vectores podem ser construídos utilizando qualquer das técnicas de construção de vectores bem conhecidas. Estas técnicas, no entanto, são modificadas na medida em que a sequência de nucleótidos que pode ser traduzida, a ser inserida no genoma da célula hospedeira é flanqueada "a montante" da sequência, por um promotor adequado e, nalgumas variações da presente invenção, a sequência de nucleótidos que pode ser traduzida é flanqueada "a jusante" por um local de poliadenilação. Isto é particularmente preferido quando a célula "hospedeira" é uma célula de insecto e a sequência de nucleótidos é transmitida por transfecção. A transfecção pode ser realizada através de numerosos métodos, incluindo o método do fosfato de cálcio, o método de DEAE-dextrano, o método de transferência estável, electroporação ou pelo método de mediação de lipossomas. Estão disponíveis vários textos que descrevem métodos de transfecção e outros processos conhecidos, para introduzir nucleótidos nas células; veja-se, e.g. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1991).

O próprio vector pode ser de qualquer tipo adequado, tal como um vector viral (ARN ou ADN), ADN de cadeia linear ou circular, nu, ou uma vesícula ou envelope contendo o material de ácido nucleico e quaisquer polipéptidos que se pretende inserir na célula. Em relação às vesículas, são bem conhecidas técnicas para construção de vesículas lipídicas, tais como lipossomas. Estes lipossomas podem ser direccionados para

células particulares, utilizando outras técnicas convencionais, tais como proporcionando um anticorpo ou outra molécula de ligação específica, no exterior do lipossoma. Veja-se e.g. A. Huang, *et al.*, J. Biol. Chem. 255:8015-8018 (1980).

A maioria dos vectores úteis contém múltiplos elementos, incluindo um ou mais dos seguintes, dependendo da natureza da célula "hospedeira" - i.e. da célula a ser transformada: (1) uma origem ou replicação de SV40 para amplificação de um número elevado de cópias; (2) um elemento promotor eficiente, para um nível elevado de iniciação da transcrição; (3) sinais de processamento de ARNm tais como clivagem de ARNm e sequências de poliadenilação (e frequentemente, também sequências intervenientes); (4) poliligantes contendo múltiplos locais de endonucleases de restrição para inserção de ADN "estranho"; (5) marcadores seleccionáveis, que podem ser utilizados para seleccionar células que integraram de forma estável o ADN de plasmídeo; e (6) sequências de controlo da replicação do plasmídeo, para permitir a propagação em células bacterianas. Além do acima descrito, muitos vectores também contém um sistema de expressão indutível, que é regulado por um estímulo externo. Foram identificadas e manipuladas em vectores de expressão, sequências de vários promotores que são necessários para a transcrição induzida, de modo a obter uma expressão indutível. Vários vectores indutíveis, úteis, basearam-se na indução pelo interferão- β , choque térmico, iões de metais pesados e esteróides (e.g. glucocorticóides). (Veja-se, e.g. Kaufman, Meth. Enzymol. 185:487-511 (1990)).

Numa concretização preferida, o vector contém também um marcador seleccionável. Após expressão, o produto da sequência nucleotídica que pode ser traduzida pode então ser purificado utilizando anticorpos contra a sequência. Um exemplo de um marcador seleccionável é a resistência à neomicina. Pode-se incluir um plasmídeo que codifica para a resistência à neomicina, tal como *phshsneo*, *phsneo* ou *pcopneo*, em cada transfecção, de modo que uma população de células que expressa o gene(s) de escolha pode ser determinada crescendo os transfectantes em meio de selecção.

Numa concretização preferida, a sequência nucleotídica que pode ser traduzida, pode ser incorporada num plasmídeo com um promotor de transcrição controlável, sequências de controlo da tradução e um poliligante, adequados, para simplificar a inserção da sequência nucleotídica que pode ser traduzida, na orientação correcta, e pode ser expressa numa célula de insecto, tal como *Drosophila*, ou numa célula procariótica, tal como *E. coli*, utilizando técnicas convencionais. De preferência, há sequências de controlo a 5', que definem um promotor para iniciação da transcrição e um local de ligação ao ribossoma, ligado de forma operacional ao terminal 5' da sequência de ADN que pode ser traduzida, a montante. Para se obterem níveis elevados da expressão do gene em células transformadas ou transfectadas - por exemplo *E. coli* - é necessário utilizar não só promotores fortes, para gerar grandes quantidades de ARNm, mas também locais de ligação ao ribossoma, para assegurar que o ARNm é traduzido de forma eficaz. Em *E. coli*, por exemplo, o local de ligação ao ribossoma inclui um codão de iniciação (AUG) e uma sequência de 3-9 nucleótidos de comprimento, localizada 3-11 nucleótidos a montante do codão de iniciação [Shine et al., Nature, 254:34 (1975)]. A sequência, AGGAGGU, que é designada por sequência de Shine-Dalgarno (SD), é complementar à extremidade 3' do ARNm de 16S de *E. coli*. A ligação do ribossoma ao ARNm e a sequência na extremidade 3' do ARNm podem ser afectadas por vários factores, incluindo (1) o grau de complementaridade entre a sequência de SD e a extremidade 3' do ARNt de 16S; e (2) o espaçamento e possivelmente a sequência de ADN que se situa entre a sequência SD e o AUG (veja-se, e.g. Roberts et al., PNAS USA 76:760 (1979a); Roberts et al., PNAS USA 76:5596 (1979b); Guarente et al., Science 209: 1428 (1980); e Guarente et al., Cell 20:543 (1980)). A optimização é geralmente conseguida medindo o nível de expressão dos genes em plasmídeos, nos quais este espaçamento é sistematicamente alterado. A comparação entre diferentes ARNm mostra que há sequências estatisticamente preferidas, entre as posições -20 a +13 (em que A do AUG está na posição 0, veja-se e.g. Gold et al., Ann. Ver. Microbiol. 35:365 (1981)]. Também se verificou que as sequências "leader" influenciam a tradução drasticamente (Roberts et al., 1979a, b *supra*). A ligação do ribossoma também pode ser afectada pela sequência de

nucleótidos a seguir a AUG, que afecta a ligação ao ribossoma. (Veja-se e.g., Taniguchi *et al.*, J. Mol Biol. 118:533 (1978)).

Um vector que pode ser utilizado de acordo com a presente invenção inclui um promotor de choque térmico. Estes promotores são conhecidos na arte; por exemplo, veja-se Stellar *et al.*, EMBO J. 4:167-171 (1985). Se este promotor for utilizado, é também preferido adicionar um local de poliadenilação.

Um vector preferido para utilização nos métodos da presente invenção é um plasmídeo; mais preferencialmente, é um plasmídeo de elevado número de cópias. Também é desejável que o vector contenha uma sequência de promotor indutível, uma vez que os promotores indutíveis tendem a limitar a pressão de selecção contra células nas quais estes vectores (que são muitas vezes construídos para transportar sequências de nucleótidos não nativas ou quiméricas) foram introduzidos. Também é preferível que o vector escolhido seja melhor adequado para expressão no hospedeiro escolhido. Se a população de células hospedeiras é uma cultura de células de *Drosophila*, então um vector compatível inclui vectores funcionalmente equivalentes àqueles como p25-lacZ (veja-se Bello e Couble, Nature 346:480 (1990)) ou pRmHa-1, -2 ou -3 (veja-se Bunch *et al.*, Nucl. Acids Res. 16:1043-1061 (1988)). Na concretização preferida, o vector é pRmHa-3, que é apresentado na Figura 1. Este vector inclui um promotor de metalotioneína, que está de preferência a montante do local em que a sequência do MHC é inserida e o local de poliadenilação está preferencialmente a jusante da referida sequência do MHC. As células de *Drosophila* são hospedeiros preferidos de acordo com a presente invenção; em particular, as células de *Drosophila* tais como células Schneider 2, têm os factores que actuam em trans necessários, requeridos para a activação do promotor e são, assim, ainda mais preferidas.

O vector de expressão pRmHa-3 baseia-se no plasmídeo bacteriano pRmHa-1, sendo este último baseado no plasmídeo pUC18. O plasmídeo pUC18 está depositado na American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD), com o número de concessão 37253. O vector pRmHa-3 contém o promotor, a sequência "leader" não traduzida 5', do gene de metalotioneína

(sequências 1-421, SEQ ID NO 13) com os locais R1 e Stu removidos; veja-se Fig. 1C). Contém também a porção 3' do gene de ADH de *Drosophila* (sequência #6435-7270, SEQ ID NO 14), incluindo o local de poliadenilação. Assim, o ADN clonado será regulado transcricionalmente pelo promotor de metalotioneína e poliadenilado. A construção do plasmídeo pRmHa-1 está descrita em Bunch *et al.*, Nucl. Acids Res. 16: 1043-1061 (1988). A construção dos plasmídeos pRmHa-3 e pRmHa-2 (em que este último tem uma sequência de promotor de metalotioneína que pode ser removida como um fragmento Eco RI) está ilustrada na Figura 1A, B e C. Em relação ao pRmHa-3, um plasmídeo preferido para utilização de acordo com a presente invenção, Pst I, Sph I e Hind III estão no fragmento do promotor e não são, portanto, únicos. O Xba está no fragmento de ADH (a 4 bases da sua extremidade 3') e também não é único. Os locais de restrição seguintes são, no entanto, únicos em pRmHa-3: Eco RI, Sac I, Kpn I, Sma I, Bam HI, Sal I, Hinc 2 e Acc I.

Uma cassette num vector de expressão de ADN é a região do vector que forma, por inserção de uma sequência de ADN que pode ser traduzida, uma sequência de nucleótidos capaz de expressar, num hospedeiro adequado, uma proteína de fusão da presente invenção. A sequência de nucleótidos competente para a expressão é referida como um cistrão. Assim, a cassette compreende preferencialmente elementos de controlo da expressão de ADN, ligados de forma operacional a uma ou mais sequências de ADN que podem ser traduzidas. Forma-se um cistrão quando uma sequência de ADN que pode ser traduzida é inserida direccionalmente (ligada direccionalmente) entre os elemento de controlo, através da sequência de nucleótidos adaptada para este fim. A sequência de ADN que pode ser traduzida, resultante, nomeadamente a sequência inserida, é, de preferência, ligada de forma operacional, na sequência de leitura adequada.

As sequências de controlo da expressão de ADN compreendem um conjunto de sinais de expressão de ADN, para expressar um produto de gene estrutural e incluem tanto elementos a 5' como a 3', como é bem conhecido, ligados de forma operacional ao cistrão, de modo que o cistrão é capaz de expressar um produto de gene estrutural. As sequências controlo 5' definem um promotor para iniciar a transcrição e um local de ligação ao

ribossoma, ligado de forma operacional ao terminal 5' da sequência de ADN que pode ser traduzida, a montante.

Assim, um vector de expressão de ADN proporciona um sistema para clonagem de sequências de ADN que podem ser traduzidas, na porção de cassete do vector, para produzir um cistrão capaz de expressar uma proteína de fusão da presente invenção.

3. Linhas celulares

Uma linha celular preferida para utilização na presente invenção é capaz de crescimento contínuo em cultura e capaz de expressar moléculas do MHC de Classe I humanas, na superfície das suas células.

A linha celular é uma linha celular de insecto. Estão disponíveis várias linhas celulares de insecto, para utilização de acordo com a presente invenção, incluindo traça (ATCC CCL 80), larvas de traça (ATCC CRL 1711), larvas de mosquito (linhas da ATCC CCL 125, CCL 126, CRL 1660, CRL 1591, CRL 6585, CRL 6586) e bicho da seda (ATCC CRL 8851). Numa concretização preferida, a linha celular é uma linha celular de *Drosophila*, tal como uma linha celular Schneider (Veja-se Schneider, J. Embryol. Exp. Morph. 27:353-365 (1972)); de preferência, a linha celular é uma linha celular Schneider 2 (S2/M3) adaptada para crescimento em meio M3 (veja-se Lindquist, et al., Drosophila Information Service 58:163 (1982)).

As células Schneider podem ser preparadas substancialmente como se segue. Colhem-se ovos de *Drosophila melanogaster* (Oregon-R) durante um intervalo de cerca de 4 horas e em seguida estas são descoradas em hipoclorito de sódio aquoso a 2,5% e esterilizadas na superfície, por imersão em etanol a 70% durante 20 minutos, seguido de mais 20 minutos em HgCl₂ a 0,05% em etanol a 70%. Após serem bem lavados em água destilada estéril, os ovos são transferidos para placas de petri contendo filtros negros Metricel estéreis, cosidos com pré-filtros Millipore, tendo ambos sido previamente humedecidos com meio de cultura. Os ovos são colocados durante a noite numa incubadora a 22°C e removidos para cultura quando

atingem 20-24 horas de idade. Os embriões são cada um cortado em metade ou em terços e em seguida colocados em tripsina a 0,2% (1:250 Difco) em solução salina de Rinaldini (Rinaldini, Nature (Londres) 173:1134-1135 (1954), durante 20-45 minutos à temperatura ambiente. Utilizam-se entre 100-300 embriões para iniciar cada cultura.

Após adição de soro fetal de bovino (FBS), os fragmentos são centrifugados a 100Xg durante 2-3 minutos, ressuspensos em 1,25 ml de meio de cultura e semeados em frascos T-9 de vidro. As culturas são mantidas a cerca de $22-27^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, com uma fase gasosa de ar ambiente. Utiliza-se preferencialmente o meio de cultura de Schneider (Schneider J. Exp. Zool. 156:91-104 (1964); Schneider, J. Embryol. Exp. Morph. 15:271-279 (1966)) contendo mais 500 mg de peptona bacteriológica, por 100 ml de meio e suplementa-se com FBS inativado a 15%. O pH (de preferência 6,7-6,8) é monitorizado com vermelho de fenol a 0,01%. As linhas celulares são preferencialmente mantidas por subcultura a cada 3-7 dias. As células ligam-se facilmente ao vidro, mas não tão firmemente que seja necessário tratamento com tripsina; tipicamente, uma pipetagem simples é adequada para arrastar a maioria das células do fundo dos frascos. A aparência morfológica das células é descrita em Schneider, J. Embryol. Exp. Morph. 27: 353-365 (1972). São essencialmente do tipo epitelial em aparência e têm desde cerca de 5-11 μm de diâmetro e 11-35 μm de comprimento. Podem encontrar-se dispersas ao acaso pelas outras células, pequenas bolsas contendo células redondas.

De preferência, as células Schneider 2 são mantidas em meio de *Drosophila* de Schenider mais FBS a 10%, incluindo penicilina (100 unidades/ml) e estreptomicina (100 mg/ml). É preferível manter as células a uma densidade de mais de $0,5 \times 10^5/\text{ml}$ e crescê-las numa gama de temperaturas de 24-30°C. As células tendem a duplicar em menos de 24 horas e crescem a uma densidade de células elevada, i.e. cerca de $2 \times 10^7/\text{ml}$ ou mais. As células podem também ser congeladas em FBS a 90% e DMSO a 10%, para utilização ou análise posteriores. Podem-se colocar as células a -70°C e em seguida armazená-las em azoto líquido.

Uma linha celular preferida de acordo com a presente invenção, identificada como células Schenider 2, foi depositada de acordo com os requisitos do tratado de Budapeste, na American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, em 18 de Fevereiro de 1992 e foi-lhe atribuído o número de concessão CRL-10974.

A linha celular é uma linha celular transformada capaz de expressar genes do MHC de Classe I humano.

Prefere-se também que a linha celular seja capaz de expressar microglobulina $\beta 2$ humana. Uma linha celular ainda mais preferida é capaz de expressão estável ou transiente.

Pode-se utilizar um vector para transformar/transfectar esta linha celular. Estão disponíveis muitos vectores que são úteis na transformação/transfecção de linhas celulares; estes vectores são discutidos com mais pormenores acima. Em resumo, no entanto, em concretizações preferidas, as células da presente invenção são transfectadas com ADNc que codificam para cadeias pesadas de MHC e microglobulina $\beta 2$ (humanos), que foram, cada uma, inseridas (i.e. ligadas de forma operacional) num vector de expressão. Numa concretização mais preferida, o vector compreende o plasmídeo de expressão de *Drosophila* pRmHa-3, no qual foram inseridas sequências de nucleótidos que podem ser expressas, que codificam para moléculas do MHC de Classe I humanas ou microglobulina $\beta 2$ humana, utilizando as técnicas aqui descritas. De preferência, os ADNc que codificam para MHC e os que codificam para microglobulina $\beta 2$ estão ligados de forma operacional a plasmídeos de expressão separados e são co-transfectados em células de cultura. Alternativamente, os ADNc que codificam para MHC e microglobulina $\beta 2$ podem ser ligados de forma operacional ao mesmo plasmídeo de expressão e ser co-transfectados através do mesmo plasmídeo. Noutra variação, os ADNc que codificam para MHC, microglobulina $\beta 2$ e uma citóquina como IL2 estão ligados de forma operacional a plasmídeos de expressão e são co-transfectados numa linha celular da presente invenção. A selecção de genes de HLA, construção de vectores adequados e a selecção de iniciadores estão descritos com mais pormenores nas secções B.1 e B.2, acima.

As células transformadas com sucesso, i.e. células que contêm uma sequência de nucleótidos humana que pode ser expressa, de acordo com a presente invenção, podem ser identificadas por técnicas bem conhecidas. Por exemplo, as células que resultam da introdução de um ADNc ou ADNr da presente invenção, podem ser clonadas para produzir colónias monoclonais. As células dessas colónias podem ser recolhidas, lisadas e o seu conteúdo de ADN pode ser examinado quanto à presença do ADNr, utilizando um método tal como o descrito por Southern, J. Mol. Biol. 98:503 (1975). Além de testar directamente quanto à presença de ADNr, uma transformação ou transfecção de sucesso pode ser confirmada por métodos imunológicos bem conhecidos, quando o ADNr é capaz de dirigir a expressão de um determinado polipéptido quimérico. Por exemplo, as células transformadas com sucesso, com um vector de expressão, podem produzir proteínas que apresentam propriedades antigénicas particulares, que são facilmente determinadas utilizando os anticorpos adequados. Além disso, pode-se determinar uma transformação/transfecção de sucesso através da utilização de um vector adicional que transporta uma sequência de marcador, tal como resistência à neomicina, como descrito anteriormente.

Também é preferível que a cultura seja capaz de um crescimento sustentado a temperaturas reduzidas. Por exemplo, é preferido que a cultura seja mantida próximo da temperatura ambiente, e.g. a cerca de 24-27°C. Noutras concretizações, a cultura é mantida a temperaturas mais elevadas, particularmente durante o processo de activação das células CD8. É, portanto, preferido, que a cultura de acordo com a presente invenção, seja capaz de suportar um desafio de temperatura de cerca de 30°C a cerca de 37°C. A adição de microglobulina β 2 a uma cultura estabiliza-a a pelo menos a um desafio de 30°C; a adição de microglobulina β 2 e péptidos resulta numa maior termoestabilidade a temperaturas mais elevadas, i.e. a 37°C.

Deste modo, é ainda mais preferido que uma linha celular para utilização na presente invenção seja capaz do seguinte: (1) crescimento sustentado a temperaturas reduzidas, durante um período de tempo predeterminado; (2) transformação por um vector de expressão; (3) expressão de microglobulina β 2; (4)

expressão de um ou mais tipos de moléculas do MHC de Classe I; (5) carregamento dos péptidos nas moléculas de MHC de Classe I; e (6) expressão de moléculas do MHC de Classe I vazias ou carregadas com péptido, na superfície da célula.

Numa concretização preferida da presente invenção, uma cultura de *Drosophila* é estabilizada e transfectada com vectores ligados de forma operacional a (1) uma ou mais sequências nucleotídicas que codificam para moléculas de MHC de Classe I humanas (2) pelo menos uma sequência nucleotídica que codifica para a microglobulina $\beta 2$ humana. Estas sequências podem ser ligadas de forma operacional ao mesmo vector mas, preferencialmente, as sequências para a microglobulina $\beta 2$ e para MHC humano estão em vectores separados. Para fins de selecção, também é vantajoso transfectar a linha celular com o vector ligado de forma operacional a um marcador seleccionável, e.g., resistência a neomicina. Subsequentemente, uma população de células que expressam moléculas de MHC de Classe I e microglobulina $\beta 2$ é seleccionada e mantida em cultura.

De modo a preparar a cultura para expressão de moléculas de MHC vazias - ou mais preferencialmente, carregadas com péptido - a cultura pode necessitar primeiro de estimulação, e.g. através de indução com CuSO_4 , durante um período de tempo predeterminado. Após um período de indução adequado - e.g. cerca de 12-48 horas, podem-se adicionar péptidos a uma concentração predeterminada (e.g. cerca de 100 $\mu\text{g/ml}$). Os péptidos podem ser preparados como discutido a seguir na secção B.5. Após novo período de incubação - e.g., durante cerca de 12 horas a 27°C - a cultura está pronta para ser utilizada na activação de células CD8. Apesar deste período de incubação adicional poder ser encurtado, ou talvez omitido, nós observámos que a cultura tende a tornar-se cada vez mais estável ao desafio de temperatura, se for deixada a incubar durante um tempo, antes da adição de células CD8 em repouso ou precursoras. Por exemplo, as culturas de acordo com a presente invenção, às quais o péptido foi adicionado, são capazes de expressar quantidades significativas de moléculas de Classe I carregadas com péptido, mesmo quando incubadas durante períodos de tempo alargados, a 37°C.

Os meios nutrientes úteis na cultura de células hospedeiras transformadas, são bem conhecidos na arte e podem ser obtidos a partir de várias fontes comerciais. Em concretizações em que a célula hospedeira é de mamífero, utiliza-se de preferência um meio "isento de soro".

4. Microglobulina $\beta 2$ humana

De modo a estabelecer uma linha celular capaz de produzir quantidades terapeuticamente úteis de moléculas de MHC de Classe I humanas expressas na superfície, é preferível co-transfectar uma linha celular com um vector ligado de forma operacional a uma sequência de nucleótidos que codifica para microglobulina $\beta 2$, de modo a se obterem níveis de expressão adequados de moléculas de MHC humanas na linha celular. Apesar da sequência de nucleótidos que codifica para a microglobulina $\beta 2$ de mamífero, tal como microglobulina $\beta 2$ de ratinho, aumentar a estabilidade das moléculas de MHC de Classe I humanas expressas nas linhas celulares, é preferível co-transfectar a linha celular com um vector ligado de forma operacional a uma sequência nucleotídica que pode ser expressa, que codifica para uma microglobulina $\beta 2$ humana. Como discutido na secção B.2. acima, um vector preferido inclui uma sequência de nucleótidos que codifica para pelo menos uma porção de uma molécula de microglobulina $\beta 2$ de mamífero, ligada de forma operacional ao vector, para expressão. Também é possível construir um vector que inclui sequências de nucleótidos que codificam tanto para uma molécula de MHC de Classe I como para uma microglobulina $\beta 2$.

Foi publicada uma sequência de ADNc de microglobulina $\beta 2$ humana (Veja-se Suggs *et al.*, PNAS 78:6613-17, 1981) e a sequência foi utilizada como molde para uma reacção em cadeia com polimerase (PCR), utilizando os seguintes iniciadores:

Iniciador 5' :

5' GCTTGGATCCAGATCTACCATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCT CGCGCTACTCTC 3'
(SEQ ID NO 15)

Iniciador 3' :

5' GGATCCGGATGGTTACATGTTCGCGATCCCACTTAAC 3'
(SEQ ID NO 16)

Os iniciadores são utilizados numa reacção de PCR convencional (veja-se secção B.1 acima e referências aí citadas). Os produtos de reacção são extraídos com fenol, purificados utilizando um *kit* Geneclean (Bio 101, San Diego, CA), digeridos com Bam HI e clonados no local de Bam HI de pBS (Stratagene, La Jolla, CA). Após verificação da sequência, este fragmento de Bam HI é clonado no local de Bam HI de um vector de expressão adequado. Na concretização preferida, o ADNC de microglobulina $\beta 2$ humana é sintetizado e ligado de forma operacional ao vector de expressão pRmHa-3.

5. Péptidos

Quase todas as proteínas celulares, juntamente com antigénios virais, podem ser utilizadas para produzir fragmentos de péptidos relevantes, que servem como ligandos de MHC de Classe I potenciais. Na maioria das células de mamífero, assim, qualquer complexo de péptido de MHC particular representaria apenas uma pequena porção do total de moléculas de MHC codificadas, encontradas na superfície celular. Deste modo, de forma a produzir moléculas de MHC de Classe I humanas expressas na superfície, que têm uma maior capacidade de activar especificamente células CD8, é preferível isolar e carregar fragmentos de péptido de tamanho e características antigénicas adequadas, em moléculas de Classe I.

Os péptidos da presente invenção ligam-se a moléculas de MHC de Classe I. A ligação ocorre sob condições biológicas que podem ser criadas *in vivo*, bem como *in vitro*. Não é necessário conhecer a natureza exacta da ligação de péptidos para a prática da presente invenção.

Numa concretização preferida, os péptidos a ser carregados nas moléculas de MHC de Classe I são antigénicos. Também é preferido que os péptidos tenham um tamanho uniforme, de preferência 8-meros ou 9-meros e mais preferencialmente 8-meros. Também é preferido que os péptidos preparados para ser carregados nas moléculas de MHC sejam de uma única espécie, i.e. que todos os péptidos carregados no MHC sejam idênticos em tamanho e sequência. Deste modo, é possível

produzir moléculas de MHC carregadas com péptidos, monoantigénicas.

Os péptidos podem ser apresentados às células por vários meios. De preferência, os péptidos são apresentados de um modo que lhes permite entrar num conjunto intracelular de péptidos. Por exemplo, os péptidos podem ser apresentados através de carga osmótica. Tipicamente, os péptidos são adicionados ao meio de cultura. Os péptidos podem ser adicionados à cultura na forma de um polipéptido ou proteína intacta, que são subsequentemente degradados por processos celulares, e.g. através de degradação enzimática. Alternativamente, o polipéptido ou proteína intacta podem ser degradados através de alguns outros meios, tais como digestão química (e.g. brometo de cianogénio) ou proteases (e.g. quimotripsina), antes da sua adição à cultura de células. Noutras concretizações, os péptidos são apresentados em segmentos mais pequenos, que podem, ou não, compreender sequências de aminoácidos epitópicos.

Numa concretização preferida, uma quantidade suficiente de proteína(s) ou péptido(s) é adicionada à cultura de células, para permitir que as moléculas de MHC de Classe I se liguem e subsequentemente apresentem uma grande densidade do péptido, - de preferência com o mesmo tipo de péptido ligado a cada MHC - na superfície das células que expressam MHC de Classe I humano. Também é preferido permitir que o MHC de Classe I humano e a microglobulina $\beta 2$ humana se liguem - i.e. formem heterodímeros - antes de apresentar o péptido às moléculas de MHC, intracelularmente.

Noutra concretização da invenção, os péptidos são adicionados a células transfectadas da presente invenção, de modo a aumentar a termoestabilidade das moléculas de MHC expressas pelas células. Como referido acima, os péptidos são preferencialmente adicionados ao meio de cultura. Os péptidos antigénicos que se ligam às moléculas de Classe I servem para termoestabilizar as moléculas de MHC e também para aumentar a expressão na superfície celular. As culturas a que se adicionaram péptidos que se ligam às moléculas de MHC são, assim, significativamente menos susceptíveis ao desafio de temperatura, do que as culturas sem adição de péptidos.

Numa concretização da presente invenção, os péptidos antigénicos são apresentados à linha celular transformada/transfectada, em várias formas. Por exemplo, uma proteína inteira ou outro polipéptido antigénico pode ser degradada química ou enzimaticamente, por exemplo, e adicionada à linha celular nesta forma. Por exemplo, uma proteína de interesse é degradada com quimotripsina e a mistura resultante de "fragmentos" de péptido é adicionada a uma cultura de células transformadas ou transfectadas; estas células são então deixadas "escolher" os péptidos adequados (que são muitas vezes péptidos menores, de preferência 8-meros ou 9-meros) para os carregar nas moléculas de MHC de Classe I. Alternativamente, uma sequência de proteína ou polipéptido inteira, pode ser clonada num vector adequado e inserida numa célula procariótica, em que a célula gera quantidades significativas do polipéptido antigénico, que são então recolhidas, purificadas e digeridas em péptidos que são então adicionados à cultura de células transformadas/transfectadas; deixar-se-á mais uma vez as células "escolher" os péptidos a carregar no MHC expresso.

6. Isolamento de células CD8 em repouso ou precursoras

As células CD8 em repouso (ou precursoras) - i.e. células T que não foram activadas para se direccionarem para um antigénio específico - são de preferência extraídas de um paciente, antes da incubação das células CD8 com as culturas transformadas que expressam moléculas do MHC humanas. Também é preferido que as células CD8 precursoras sejam recolhidas de um paciente antes do início de outro tratamento ou terapia, que possa interferir com a capacidade das células CD8 serem especificamente activadas. Por exemplo, quando se pretende tratar um indivíduo com uma neoplasia ou um tumor, é preferível obter uma amostra de células e fazer a cultura das mesmas, antes do início da quimioterapia ou tratamento com radiação.

Os métodos de extracção e cultura de linfócitos são bem conhecidos. Por exemplo, a patente U.S. No. 4690915 de Rosenberg descreve um método para obter grandes quantidades de linfócitos através de linfocitoforese. As condições de cultura

adequadas utilizadas são as de células de mamífero, que são tipicamente realizadas a 37°C.

Também estão disponíveis vários métodos para separar e/ou enriquecer culturas de células CD8 precursoras. Alguns exemplos de métodos gerais para separação de células incluem a ligação indirecta das células a superfícies especificamente revestidas. Noutro exemplo, os linfócitos de sangue periférico humano (PBL), que incluem células CD8, são isolados por centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Piscataway, NJ). Os linfoblastos PBL podem ser utilizados imediatamente a seguir, ou podem ser armazenados em azoto líquido, após congelação em FBS contendo DMSO a 10% (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo), que conserva a viabilidade celular e as funções dos linfócitos.

Métodos alternativos de separar e/ou enriquecer culturas de células precursoras, incluem os seguintes exemplos. Após as populações de PBL enriquecidas em linfócitos serem preparadas a partir de sangue total, isolam-se sub-populações de linfócitos CD8 por técnicas de separação baseadas em afinidade, direccionadas para a presença do antigénio do receptor de CD8. Estas técnicas baseadas em afinidade incluem microfluorimetria de fluxo, incluindo separação de células activada por fluorescência (FACS), adesão de células e métodos semelhante (Veja-se e.g., Scher e Mage in Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., pp. 767-780, River Press, NY (1984)). Os métodos de afinidade podem utilizar anticorpos anti-receptor de CD8 como fonte de reagente de afinidade. Alternativamente, pode-se utilizar o ligando natural, ou análogos de ligando, do receptor de CD8, como reagente de afinidade. Estão geralmente disponíveis vários anticorpos monoclonais anti-células T e anti-CD8, para utilização nestes métodos, de uma variedade de fontes comerciais, incluindo a American Type Culture Collection (Rockville, MD) e Pharmigen (San Diego, CA). Dependendo da designação do antigénio, poderão ser adequados anticorpos diferentes (Para uma discussão e revisão da nomenclatura, designação de antigénios e anticorpos atribuídos para leucócitos humanos, incluindo células T, veja-se Knapp, et al., Immunology Today 10:253-258 (1989)). Por exemplo, os anticorpos monoclonais OKT4 (anti-CD4, ATCC No. CRL 8002), OKT 5 (ATCC Nos CRL 8013 e 8016),

OKT 8 (anti-CD8, ATCC No. CRL 8014) e OKT 9 (ATCC No. CRL 8021) estão identificados no catálogo de linhas celulares e hibridomas da ATCC (ATCC, Rockville, MD) como sendo reactivos com linfócitos T humanos, subconjuntos de células T humanas e células T activadas, respectivamente. Estão disponíveis vários outros anticorpos para identificação e isolamento de espécies de células T.

De preferência, os PBL são então purificados. Por exemplo, podem-se utilizar gradientes de Ficoll para este fim. Os PBL purificados serão então misturados com células de *Drosophila* isogénicas, previamente incubadas com os péptidos antigénicos adequados.

7. Activação *in vitro* de células CD8

De modo a otimizar as condições *in vitro* para a produção de células T citotóxicas específicas, a cultura de células estimuladoras é mantida num meio adequado. Na concretização preferida, as células estimuladoras são células de *Drosophila*, que são preferencialmente mantidas em meio isento de soro (e.g. Excell 400).

Antes da incubação das células estimuladoras com as células a ser activadas, e.g. células CD8, adiciona-se uma quantidade de péptido antigénico à cultura de células estimuladoras, em quantidade suficiente para serem carregados nas moléculas de Classe I humanas a ser expressas na superfície das células estimuladoras. De acordo com a presente invenção, uma quantidade suficiente de péptido é uma quantidade que irá permitir que cerca de 200, e preferencialmente 200 ou mais, moléculas de MHC de Classe I, humanas, carregadas com péptido sejam expressas na superfície de cada célula estimuladora. De preferência, as células estimuladoras são incubadas com >20 µg/ml de péptido.

As células CD8 em repouso ou precursoras, são então incubadas com as células estimuladoras adequadas, durante um período de tempo suficiente para activar as células CD8. De preferência, as células CD8 serão então activadas de um modo específico do antigénio. A razão entre células CD8 em repouso ou precursoras (efectoras) e células estimuladoras pode variar

de indivíduo para indivíduo e poderá depender ainda de variáveis, como a susceptibilidade dos linfócitos de um indivíduo às condições de cultura e a natureza e gravidade da condição de doença, ou outra condição para a qual a modalidade de tratamento descrita é utilizada. De preferência, no entanto, a razão linfócito:célula estimuladora (e.g. célula de *Drosophila*) é de preferência na gama de cerca de 30:1 a 300:1. Por exemplo, numa concretização, misturaram-se 3×10^7 PBL humanos e 1×10^6 células de *Drosophila* e manteve-se em 20ml de meio de cultura RPMI 1640.

A cultura de efector/estimulador pode ser mantida durante tanto tempo quanto o necessário para estimular um número de células CD8 terapeuticamente utilizável, ou eficaz. Em termos gerais, o tempo óptimo é entre cerca de um e cinco dias, observando-se geralmente um "patamar" - i.e. nível de activação de CD8 específicas "máximo" - após cinco dias de cultura. Numa concretização da presente invenção, a activação *in vitro* de células CD8 é detectada num breve período de tempo, após a transfecção de uma linha celular. Numa concretização, a expressão transiente numa linha celular transfectada, capaz de activar células CD8, é detectável dentro de 48 horas de transfecção. Isto indica claramente que, quer as culturas estáveis, quer transientes, de células transformadas que expressam moléculas de MHC de Classe I, são eficazes em activar células CD8.

8. Separação de células CD8 de células de *Drosophila*

As células CD8 activadas podem ser eficazmente separadas das células estimuladoras (e.g. *Drosophila*), utilizando um de uma variedade de métodos conhecidos. Por exemplo, podem-se utilizar anticorpos monoclonais específicos para as células estimuladoras, para os péptidos carregados nas células estimuladoras, ou para as células CD8 (ou um seu segmento), para ligar o seu ligando complementar adequado. As moléculas marcadas com anticorpo podem então ser extraídas da mistura de células estimuladoras-efectoras, através de meios adequados, e.g. por métodos de imunoprecipitação ou imunoensaio, bem conhecidos.

9. Administração de células CD8 activadas

As quantidades de células CD8 activadas, citotóxicas, eficazes, podem variar entre utilizações *in vitro* e *in vivo*, bem como com a quantidade e tipo de células que são o alvo final destas células "matadoras". A quantidade irá também variar com base na condição do paciente e deverá ser determinada com consideração de todos os factores adequados, pelo clínico. De preferência, no entanto, utilizam-se 1×10^6 a cerca de 1×10^{12} , mais preferencialmente de cerca de 1×10^8 a cerca de 1×10^{11} e ainda mais preferencialmente, cerca de 1×10^9 a cerca de 1×10^{10} células CD8 activadas, para humanos adultos, em comparação com cerca de $5 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ células, utilizadas em ratinhos.

De preferência, como discutido acima, as células CD8 activadas são recolhidas a partir da cultura de células de *Drosophila*, antes da administração das células CD8 ao indivíduo a ser tratado. É importante notar, no entanto, que ao contrário de outras modalidades de tratamento presentes e propostas, o presente métodos utiliza um sistema de cultura de células (i.e. células de *Drosophila*) que não são tumorigénicas. Deste modo, se a separação completa de células de *Drosophila* e células CD8 activadas não é alcançada, não se conhece nenhum perigo inerente associado com a administração de um pequeno número de células de *Drosophila*, enquanto que a administração de células promotoras de tumor de mamífero pode ser extremamente perigosa.

Os métodos para reintroduzir componentes celulares são conhecidos na arte e incluem processos como os exemplificados na patente U.S. No. 4844893 de Honsik et al. e Patente U.S. No. 4690915 de Rosenberg. Por exemplo, a administração de células CD8 activadas através de infusão intravenosa é adequada.

10. Tipagem de HLA

Como referido anteriormente, os haplótipos/alótipos de HLA variam de indivíduo para indivíduo e, apesar de não ser essencial para a prática da presente invenção, é muitas vezes útil determinar o tipo de HLA do indivíduo. O tipo de HLA pode ser determinado através de processos de tipagem convencionais,

e os PBL purificados por gradientes de Ficoll. Os PBL purificados seriam então misturados com células de *Drosophila* isogénicas, previamente incubadas com os péptidos antigénicos adequados - e.g. aplicações terapêuticas relativas a infecções virais, cancros ou malignidades, péptidos derivados de proteínas específicas de vírus ou cancro.

Continuando a utilizar condições virais ou malignas como um exemplo, nos casos em que os péptidos específicos de um antigénio específico de vírus ou de cancro particular, foi caracterizado, utilizar-se-ão de preferência, os péptidos sintetizados que codificam para estes epítomos. Nos caso em que os péptidos antigénicos preferidos não foram especificamente determinados, podem-se utilizar fragmentos digeridos com protease, de proteínas específicas de vírus ou de cancro. Como uma fonte deste antigénio, o ADNc que codifica para proteínas específicas de vírus ou de cancro é clonado num plasmídeo de expressão bacteriano e utilizado para transformar bactérias, e.g. através de métodos aqui descritos.

Após a tipagem do HLA, se não estão disponíveis células de *Drosophila* que expressem o HLA preferido, podem-se clonar os ADNc que codificam para o HLA preferido, utilizando uma reacção em cadeia com polimerase. Os iniciadores descritos na secção B.1 acima, (SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 12) podem ser utilizados para amplificar os ADNc de HLA-A, -B, -C, -E, -F ou -G adequados, em reacções separadas, que podem então ser clonados e sequenciados como descrito nos métodos descritos para HLA A2.1, a seguir. Podem então estabelecer-se linhas celulares estáveis que expressam o HLA clonado, em células de *Drosophila*. Alternativamente, uma população de células de insecto que expressam de forma transiente uma população de moléculas recombinantes clonadas, da reacção de PCR, podem ser utilizadas para activação de CD8 *in vitro*.

11. Mitogénio de *Drosophila*

Verificou-se agora que o sobrenadante das células cultivadas de acordo com a presente invenção aumenta, ou recupera, a capacidade das linhas celulares produzirem células D8 activadas, específicas. A adição de sobrenadante de cultura de *Drosophila* a cerca de 10% a uma cultura de linfócitos, ou a células fixadas, activa de forma eficaz CD8. As células

cultivadas que expressam os antigénios de Classe I isogénicos, que não conseguiram activar as CD8 na cultura primária, foram capazes de produzir CD8 específicas, após a adição do sobrenadante de cultura de células de *Drosophila*.

Um factor isolado da cultura, que parece ter um impacto significativo na activação de CD8 em culturas de células de *Drosophila* é o mitogénio de células de *Drosophila*. O mitogénio caracteriza-se como uma substância segregada, solúvel, com boa estabilidade, que manteve a sua actividade, mesmo após quatro meses de armazenamento a 4°C. O mitogénio tem um peso molecular relativamente grande - i.e. 500 kDa por filtração em gel de Superose 6 (Pharmacia, Piscataway, NJ). Também se liga fortemente a Mono Q Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ). O mitogénio de células de *Drosophila* induz aparentemente a proliferação de células B e activa macrófagos.

O mitogénio encontrado em *Drosophila* pode ser um exemplo de outros mitogénios de insecto e poderá proporcionar um adjuvante terapêutico eficaz. Por exemplo, podem-se remover células de um animal infectado e utilizá-las para estimular células de *Drosophila*, subsequentemente misturadas com linfócitos de sangue primário e mitogénio de *Drosophila*. A mistura pode ser então utilizada para tratamento do organismo.

EXEMPLOS

Os exemplos que se seguem pretendem ilustrar, e não limitar, a presente invenção.

Exemplo 1

Expressão de moléculas de MHC de Classe I humanas

A. Preparação do vector de expressão pRmHa-3

O vector de expressão pRmHa-3 para utilização na expressão de proteínas de MHC em células de *Drosophila* Schneider 2, como descrito nesta invenção, foi construído ligando um vector de expressão de ADN pRmHa-1 linearizado com Sph I, com um fragmento de ADN resultante de um fragmento de digestão com Sph I de um vector de expressão pRmHa-2, como descrito a seguir. A ligação de pRmHa-1 com o fragmento pRmHa-2 deste modo, foi realizada para remover um de dois locais de clonagem da endonuclease de restrição Eco RI, que

estão presentes em pRmHa-1. Assim, o vector de expressão pRmHa-3 resultante, apenas continha um local de restrição de Eco RI no local de clonagem múltipla (poliligante), no qual se inseriram vários fragmentos de ADN que codificam para MHC, como descrito nos Exemplos.

1. Preparação do vector de expressão pRmHa-1

O vector de expressão pRmHa-1, contendo um promotor de metalotioneína, sequências de consenso de resposta a metais (designadas por MT) e um gene de álcool desidrogenase (ADH) contendo um sinal de poliadenilação isolado de *Drosophila melanogaster*, foi construído como descrito em Bunch *et al.*, Nucl. Acids Res. 16: 1043-61 (1988). Mostra-se um esquema da construção final de pRmHa-1 na Figura 1B. Utilizou-se o vector de expressão plasmídeo, pUC18, com o número de concessão da ATCC, 37253, como vector fonte, a partir da qual os vectores subsequentes aqui descritos foram derivados. O plasmídeo pUC18 contém os seguintes locais de restrição, de 5' para 3', no local de clonagem múltipla, não estando todos ilustrados nas representações esquemáticas dos vectores derivados de pUC18 na Figura 1: Eco RI; Sac I; Kpn I, Sma I e Sma I localizados na mesma posição; Bam HI; Xba I; Sal I, Acc I e Hinc II localizados na mesma posição, Pst I; Sph I e Hind III. O vector pUC18 foi primeiro digerido com Hind III, para formar um pUC18 linearizado. Criaram-se então extremidades rombas, preenchendo as extremidades Hind II com o fragmento grande de polimerase I de ADN, como descrito em Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, eds Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque (1982).

O vector pUC18 de extremidades rombas, linearizado, resultante, foi ligado com um fragmento Hinf I de 740 pares de bases (pb) do gene de ADH de *Drosophila melanogaster*, contendo um sinal de poliadenilação. O alelo de ADH ligado foi primeiro isolado do plasmídeo pSAC1, descrito por Goldberg *et al.*, PNAS USA 77: 5794-5798 (1980), por digestão com Hinf I e em seguida tornaram-se as extremidades rombas, com o fragmento Klenow, resultando na sequência de nucleótidos discriminada na SEQ ID NO. 14. O vector pSAC1 contendo o alelo de ADH foi construído, subclonando em pBR322 (No. de concessão da ATCC, 31344) um fragmento Eco RI de 4,7 quilobases (kb) de ADN de *Drosophila*,

seleccionado de uma biblioteca de bacteriófago lambda, contendo peso molecular elevado (mais de 15 kb), ao acaso. O local de restrição Hinf I 5' ocorreu naturalmente no gene de ADH, na posição 1770, como descrito por Kreitman, Nature 304:412-417 (1983). O local Hinf I 3' foi derivado do vector pUC 18, no qual o gene de ADH tinha sido clonado. Esta posição era 4 bases 3' do local de Xba I na posição 2500 do gene de ADH. O segmento de ADH estendia-se desde 35 pb a montante da sequência de poliadenilação/clivagem, na porção 3' não traduzida do ARNm de ADH, até 700 pb a jusante do sinal de poliadenilação. O vector derivado de pUC18 resultante, contendo o fragmento do gene de ADH, foi designado por pHA-1, como se mostra na Figura 1A.

O fragmento do gene MT Eco RI/Stu I de 421 pb foi obtido de um clone contendo ADN, de aproximadamente 15,3 numa biblioteca de ADN genómico de *Drosophila melanogaster*. A biblioteca, preparada com uma digestão parcial com Mbo I de ADN imaginal, foi clonada no derivado lambda EMBL4. O fragmento continha o promotor de MT e elementos de consenso de resposta a metais, do gene MT de *Drosophila* (Maroni *et al.*, Genetics 112:493-504 (1986)). Esta região, contendo o promotor e o local de iniciação da transcrição no nucleótido 1+, correspondia à posições -370 até à posição de nucleótido +54 do gene MT (SE ID NO 13). O fragmento resultante foi então ligado no vector de expressão pHA-1, preparado acima, que foi previamente linearizado com Eco RI e Sma I. A extremidade 3' romba em MT, criada pelo fragmento digerido com Stu I, era compatível com a extremidade romba em pHA-1, criada pelo fragmento digerido com Sma I. O vector derivado de pUC18 resultante, contendo um gene 5' de MT de *Drosophila*, e um fragmento 3' do gene de ADH, foi designado por pRmHa-1. O vector de expressão pRmHa-1, mostrado na Figura 1B, continha a origem de replicação (ori) e o gene de beta-lactamase que confere resistência a ampicilina (Amp^r) de pUC18, como se mostra na Figura 1A no vector pHa-1. O diagrama de pRmHa-1 também mostra as posições 5' a 3' contíguas, do fragmento do gene MT, o local de clonagem múltipla e o fragmento do gene de ADH. O vector pRmHa-1 foi utilizado como descrito em c. a seguir, na construção do vector de expressão pRmHa-3.

2. Preparação do vector de expressão pRmHa-2

A construção do vector pRmHa-2 é apresentada na Figura 1A. Para a construção do vector de expressão pRmHa-2, o fragmento de MT preparado acima foi inserido no vector derivado de pUC18, pHA-1, como descrito para construir pRmHa-1 acima, com algumas modificações. Adicionou-se um ligante Eco RI ao local Stu I do fragmento do gene MT isolado com Eco RI/Stu I, preparado acima, para formar um fragmento de metalotioneína com locais de restrição de Eco RI em ambas as extremidades. O fragmento resultante foi então ligado no fragmento de ADH contendo o vector de expressão pUC18, que foi anteriormente linearizado com Eco RI. O vector derivado de pUC18 resultante, contendo um fragmento 5' do gene MT de *Drosophila* e um fragmento 3' do gene de ADH com dois locais de restrição de Eco RI, 5' em relação ao local de clonagem múltiplo, foi designado por pRmHa-2. O vector de expressão pRmHa-2, apresentado na Figura 1A, continha a origem de replicação (ori) e o gene de beta-lactamase que confere resistência a ampicilina (Amp^r) de pUC18. O diagrama de pRmHa-2 também mostra as posições contíguas 5' a 3' do fragmento do gene MT, o local de clonagem múltipla e o fragmento do gene de ADH. O vector de pRmHa-2 foi utilizado juntamente com pRmHa-1 como descrito em c. a seguir, na construção do vector de expressão pRmHa-3.

3. Preparação do vector de expressão pRmHa-3

Para preparar o vector de expressão pRmHa-3 que tinha apenas um local de restrição de Eco RI, ligou-se um fragmento de pRmHa-2 no pRmHa-1. Para esta construção, o pRmHa-2 preparado em b. acima, foi primeiro digerido com Sph I. O fragmento Sph I resultante, começando no meio do gene MT e estendendo-se até ao local Sph I no local de clonagem múltipla, foi primeiro isolado do vector pRmHa-2 e em seguida ligado em pRmHa-1, preparado em A.1. acima. O vector pRmHa-1 foi previamente modificado, para remover o local de restrição de Eco RI, 5' em relação ao fragmento do gene MT, e em seguida linearizado com Sph I. Este processo está ilustrado esquematicamente na Figura 1B. Para remover o local Eco RI em pRmHa-1, o vector foi primeiro digerido com Eco RI, para formar um vector linearizado e em seguida as extremidades

foram tornadas rombas com nuclease de feijão *mung* e ligadas de novo.

O vector pRmHa-1 que não possui um local de Eco RI foi então digerido com Sph I, para remover a região correspondente ao fragmento de inserção de Sph I de pRmHa-2 e formar um vector pRmHa-1 linearizado. O fragmento Sph I de pRmHa-2 foi então ligado no pRmHa-1 linearizado com Sph I, para formar o vector de expressão pRmHa-3. Na Figura 1C mostra-se um esquema do vector pRmHa-3. As posições relativas dos vários locais de restrição do vector pUC18, a partir do qual o pRmHa-3 foi derivado, são indicadas na Figura. Além disso, as posições relativas e comprimentos dos fragmentos do gene de MT e de ADH, separadas pelo local de clonagem múltipla (poliligante), no qual o gene de MHC de interesse é clonado, estão indicadas na Figura. O vector pRmHa-3, que deriva de pUC18, contém a origem de replicação e o gene de beta-lactamase que confere resistência a ampicilina, de pUC18. Assim, os fragmentos de ADN que codificam para MHC, preparados de acordo com a invenção e clonados num local de clonagem múltipla de pRmHa-3, foram transcricionalmente regulados pelo promotor de MT e poliadenilados pelo gene de ADH.

B. Síntese de ADNc

Para sintetizar o HLA A2.2, faz-se a clonagem do ADNc que codifica para A2.2 completo (veja-se Holmes *et al.*, J. Immunol 139:936-41 (1987), para a sequência publicada) num plasmídeo M13mp19, um vector bacteriófago disponível no mercado (Stratagene, La Jolla, CA). O ADNc é sintetizado por PCR, utilizando iniciadores derivados da sequência de A2 publicada. O ADNc é libertado de um clone de M13mp19 como um fragmento Not I (porção pendente preenchida com Klenow)/Eco RI. (Os fragmentos Klenow são parte da molécula de polimerase I de ADN de *E. coli*, produzida por tratamento da poli I de ADN de *E. coli* com subtilisina. São utilizados para "preencher" porções pendentes 5' ou 3', nas extremidades de moléculas de DNA, produzidas por endonucleases de restrição). O fragmento Not I/Eco RI é inserido em pSP64T digerido com Bg III (extremidades preenchidas com Klenow) e Eco RI. O pSP64T é um vector de clonagem SP6, concebido para proporcionar regiões flanqueadoras 5' e 3' de um ARNm que é eficazmente traduzido

(β -globina) em qualquer ADNc que contém o seu próprio codão de iniciação. Este vector SP6 de tradução foi construído por digestão de pSP64-X β m com Bal I e Bst EII, preenchendo as extremidades pendentes com polimerase de ADN de T4 e adicionando um ligante Bgl II por ligação. A Bal I corta o ADNc de β -globina duas bases a montante do ATG (codão de iniciação) e a Bst EII corta oito pares de bases a montante do TAA (codão de terminação). Há apenas um local de Bgl II em pSP64T, de modo que as enzimas de restrição que cortam no fragmento poliligante de Pat I a Eco RI, podem ainda ser utilizadas para linearizar o plasmídeo, para transcrição. (Veja-se Kreig e Melton, Nucleic Acid Res. 12:7057-7070 (1984), que também descrevem a construção do plasmídeo pSP64-X β m). O plasmídeo resultante é clivado com Eco RI (extremidade preenchida com Klenow) e Hind III, que é clonado no poliligante de pCMUII entre Hind III (5') e Stu I (3'). (veja-se Paabo *et al.*, EMBO J. 5: 1921-1927 (1986)). Todo o ADNc é removido como um fragmento Hind III (extremidade preenchida com Klenow) Bam HI, que é clonado em pRmHa-3 clivado com Sma I e Bam HI.

Preparou-se HLA A2.2 sol, manipulando um codão de terminação no ADNc de A2.2 acima descrito, imediatamente antes do domínio transmembranar. A mutagénese é conseguida clivando o ADNc de A2.2 clonado no vector de expressão eucariótico pCMUII, entre Hind III 5' e Stu I 3' (veja-se acima) com Mbo II e Bam HI, inserindo os seguintes oligonucleótidos:

Iniciador 5': 5' GGAGCCGTGACTGACTGAG 3' (SEQ ID NO 17)

Iniciador 3': 5' CCCTCGGCACTGACTCCTAG 3' (SEQ ID NO 18)

O plasmídeo recombinante resultante é clivado com Hind III, a extremidade pendente é preenchida com Klenow e em seguida cortada com Bam HI, libertando um fragmento de restrição que é clonado em pRmHa-3, do mesmo modo que o A2.2 de comprimento total.

O ADNc de HLA A2.1 é preparado como se segue. Uma sequência de ADNc de HLA A2.1 truncada é sintetizada por PCR, utilizando os seguintes iniciadores, derivados da sequência de A2.1 publicada (Koller e Orr, J. Immunol. 134:2727-2733

(1985)) e as condições de reacção descritas em Nilsson *et al.*; Cell 58:707-718 (1989).

Iniciador 5': 5' GCGGATCCATGGCCGTCATGGCGCCC 3' (SEQ ID NO 19)

Iniciador 3': 5' CGGAATTCTCATCAGGGCTTCGGCAGCCC 3' (SEQ ID NO 20)

O fragmento de PCR resultante é clonado em pBS (Stratagene, La Jolla, CA) e a sequência é verificada por sequenciação didesoxi. Um fragmento de 800 pb que codifica para a maioria da sequência codificante de HLA A2.1 é cortado deste plasmídeo com Ava I e Stu I e utilizado para substituir o mesmo fragmento na sequência transmembranar de HLA A2.2, que foi previamente clonada em pRmHa-3 (veja-se acima).

O HLA B7 é sintetizado por PCR, utilizando iniciadores derivados da sequência de B7 publicada (veja-se, e.g. Zemmour e Parham, Immunogenetics 33:310-320 (1991)), flanqueados por locais Bam HI, clonados directamente no local de Bam HI de pRmHa-3 (veja-se Sood *et al.*, Immunogenetics 22:101-121 (1988)).

O ADNc de HLA B27 é sintetizado por PCR, utilizando iniciadores derivados da sequência de B27 publicada (veja-se e.g. Zemmour e Parham, Immunogenetics 33:310-320 (1991)). Outros pormenores são dados imediatamente a seguir.

O ADNc de HLA B27 sol é preparado como o ADNc de B7 sol acima, mas incorporando o codão de terminação na extremidade do domínio alfa 3 do clone pBI (veja-se Szotz *et al.*, PNAS 83:1428 (1986)). Tanto o ADNc de B27 truncado, como o de comprimento total, são obtidos no vector pDS5, com uma extremidade 5' modificada (veja-se Stueber *et al.*, EMBO J 3:3143-3148 (1986)). Faz-se mutagénesis direccionada para o local, para estender a extremidade 5' do ADNc. A sequência seguinte (em maiúsculas) é adicionada ao clone de ADNc de B27 publicado; a sequência após a barra (/) é o começo da sequência publicada:

GGATCCTCTCAGACGCCGAGATGCGGGTC/ acggcgccc... (SEQ ID NO 21)

Os ADNc completos de B27 e B27 sol são cortados do plasmídeo pDS5, cortando primeiro com Apa LI (extremidade

preenchida com Klenow) e Bam HI. Os fragmentos resultantes são clonados directamente em pRmHa-3 clivado com Sal I (preenchido com Klenow) e Bam HI.

Os ADNc que codificam para qualquer HLA preferido podem ser clonados por utilização da reacção em cadeia com polimerase. Os iniciadores descritos na secção B.1. acima (SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 12) podem ser utilizados para amplificar os ADNc de HLA-A, -B, -C, -E, -F e -G adequados, em reacções separadas, que podem então ser clonados e sequenciados como descrito nos métodos acima referidos para HLA A2.1. A preparação de ADNc a partir de células humanas, é realizada como descrito em Ennis, *et al.*, PNAS USA 87:2833-2837 (1990). Em resumo, obtém-se uma amostra de sangue de um indivíduo e as células são recolhidas após centrifugação e utilizadas para preparar ARN total. Sintetiza-se o ADNc da primeira cadeia, utilizando oligo(dT) e transcriptase inversa do vírus de mieloblastose de ave. O ADNc resultante é utilizado numa reacção de amplificação por PCR, utilizando o(s) iniciador(es) de síntese adequado(s) como referido na secção B.1 acima e um *kit* da GeneAmp e um aparelho de ciclos térmicos (Perkin-Elmer/Cetus). As condições reaccionais são preferencialmente como se segue. Utilizam-se 100 ng de molde de ADNc e 50 picomoles de cada iniciador oligonucleotídico. Fazem-se 30 ciclos como se segue: (a) um minuto a 94°C; (b) um minuto a 60°C; e (c) um minuto, 30 segundos a 72°C. A reacção de PCR é então aquecida a 100°C durante 10 minutos, para matar a polimerase de Taq e as extremidades do ADN são tornadas rombas por polimerase de T4 (Stratagene, San Diego, CA).

O ADNc de microglobulina β 2 humana é preparado utilizando uma sequência de ADNc parcial publicada (veja-se Suggs *et al.*, PNAS 78:6613-17, 1981) é utilizado como molde para uma reacção em cadeia com polimerase (PCR) com os seguintes iniciadores:

Iniciador 5' :

5' GCTTGGATCCAGATCTACCATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTC 3'
(SEQ ID NO 15)

Iniciador 3' :

5' GGATCCGGATGGTTACATGTGCGGATCCCACTTAAC 3'
(SEQ ID NO 16)

Os iniciadores são utilizados numa reacção de PCR convencional (veja-se Nilsson *et al.*, Cell 58: 707 (1989)). Os produtos de reacção são extraídos com fenol, purificados utilizando um kit Geneclean (Bio 101, San Diego, CA) digeridos com Bam HI e clonados no local de Bam HI de pBS (Stratagene, La Jolla, CA). Após verificação da sequência, este fragmento de Bam HI é clonado no local de Bam HI de pRmHa-3.

Como se pode ver nos exemplos, utilizou-se ADNc de Classe I de murídeo em várias situações. O ADNc de Classe I de murídeo foi preparado como se segue.

H-2K^b: o ADNc que codifica para uma molécula de K^b completa é obtido a partir de um plasmídeo de expressão pCMU/K^b, construído como se segue. Um ADNc de H-2K^b parcial, que não possui a sequência "leader" e a maior parte do domínio alfa I, é preparado de acordo com o método de Reyes *et al.*, PNAS 79: 3270-74 (1982), produzindo pH202. Este ADNc é utilizado para produzir uma molécula de comprimento total. A sequência que falta é proporcionada utilizando um clone genómico que codifica para H-2K^b (Caligan *et al.*, Nature 291:35-59, 1981) como um molde, numa reacção de PCR, utilizando um iniciadores 5', flanqueado por um local Not I, seguido de 21 nucleótidos que codificam para os últimos sete aminoácidos da sequência "leader" e 18 nucleótidos complementares com o início do domínio alfa I e um iniciadores 3', complementar com a região que engloba o local Sty I. O fragmento resultante é ligado com pH202 no local de Sty I. A sequência 5' que codifica para o remanescente da sequência sinal é obtida a partir do ADNc de D^b (veja-se a seguir), como um fragmento Bam HI/Not I. Toda a região codificante é clivada do plasmídeo de expressão, como um fragmento Bam HI e clonada em pRmHa-3 clivado com Bam HI.

H-2L^d: o ADNc que codifica para uma molécula L^d completa é obtido a partir de um vector de expressão pCMUIV/L^d (veja-se Joly e Oldstone, Gene 97:213, 1991). O ADNc completo é clivado de um vector de expressão eucariótico pCMUIV/L^d como um fragmento Bam HI e clonado em pRmHa-3 como K^b.

H-2D^b: o ADNc que codifica para uma molécula D^d completa é obtido a partir do plasmídeo de expressão pCMUIV/D^d (veja-se

Joly e Oldstone, Science 253:1283-85, 1991). O ADNc completo é clivado de um vector de expressão eucariótico pCMUIV/D^d como um fragmento Bam HI e clonado em pRmHa-3 como K^b.

Microglobulina β 2 de murídeo: o ADNc de microglobulina β 2 de murídeo de comprimento total é obtido como um fragmento Hind III (5') (preenchido com Klenow)/Bgl II (3') a partir do ADNc de microglobulina 132 de ratinho de pSV2neo (ATCC No. 37149) e clonado em pRmHa-3 clivado com Sma I e Bam HI.

Como referido anteriormente, o vector pCMU (pCMUIV) é derivado do vector de expressão eucariótica pC81G, como descrito em Nilsson *et al.*, *supra*. O vector pC81G, por sua vez, é derivado de pA81G (Paabo *et al.*, Cell 33:445-453 (1983)) de acordo com o método descrito em Paabo *et al.*, EMBO J. 5:1921-7(1986). Em resumo, estes vectores foram construídos como se segue.

As sequências "leader" de 220 pb do vector pA81G são encurtadas, eliminando um fragmento Hind III a Dde I de 80 pb (nt 1286-1366 da sequência publicada por Herisse *et al.*, NAR 8:2173-2192 (1980)); esta construção é designada pB81G. Um fragmento Hinf I do gene de alfa globina, que abrange a região desde nt-112 a +19, em relação ao local de iniciação da transcrição, foi subclonado no local de Pst I de pUC9 e inseriu-se o potenciador de repetição de 72b de SV40, a montante do promotor. Este elemento promotor-potenciador foi primeiro testado fazendo a sua clonagem em frente da região codificante do antigénio-T de SV40, e a construção resultante foi transfectada em células HeLa (ATCC CCL 185). As células foram fixadas após dois dias e coradas para antigénio-T por imunofluorescência indirecta. Observou-se um grande número de núcleos corados, indicando uma actividade de promotor forte, do fragmento de alfa-globina. O promotor de SV40 no vector pB81G foi então substituído por este elemento promotor eficiente, levando à construção pC81G.

O pCMUIV foi construído digerindo pC81G com Hind III e Bam HI e inserindo oligonucleótidos que codificam para a sequência 5' não traduzida do ADNc de β -globina de *Xenopus laevis*, utilizada para produzir pSP64T (Krieg *et al.*, NAR 12:7057-7070 (1984)). No entanto, escolheu-se um local Bam HI

em vez do local Bgl II utilizado em pSP64T. A sequência inserida entre Hind III e Bam HI de pC81G era:

5' AGCTTGAGCACTTGTCTTTTTGCAGAAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTG 3'
(SEQ ID NO 22).

O vector phshsneo confere resistência a neomicina (G418) e é um derivado de phsneo (pUChsneo) com uma sequência adicional de promotor de choque térmico (hs), que pode ser sintetizado a partir do pUC18 disponível no mercado, como descrito em Steller *et al.*, EMBO J. 4:167 (1985). O promotor de choque térmico contido nestes vectores é o promotor de hsp70. Outros vectores úteis que conferem resistência a neomicina (resistência a G418) incluem o vector cosmídeo smart2 (ATCC 37588), que é expresso sob o controlo do promotor hsp70 de *Drosophila* e o vector plasmídeo pcponeo (ATCC 37409).

C. Inserção de genes em vectores de expressão

Os produtos de restrição são submetidos a electroforese num gel de agarose a 1% (Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)). Os fragmentos de restrição que codificam para os ADNc são cortados do gel e purificados a partir da agarose, utilizando "Geneclean"; de acordo com as instruções do fabricante (Bio 101, San Diego, CA). O plasmídeo de expressão de *Drosophila* pRmHa-3 (veja-se Bunch, *et al.*, Nucl. Acids Res. 16:1043-61, 1988) é clivado com as enzimas de restrição adequadas, num tampão One Phor All, de acordo com as instruções do fabricante (Pharmacia, Piscataway, NJ) e tratado com fosfatase alcalina, como descrito na literatura do fabricante (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Misturam-se 100 ng de vector pRmHa-3 clivado e submetido a fosfatase, com 300 ng de ADNc da cadeia pesada de MHC de Classe I, purificado em gel de agarose, ou ADNc de microglobulina $\beta 2$ e ligam-se utilizando ligase de ADN de T4 e tampão One Phor All, como descrito na literatura do fabricante. Após incubação a 16°C durante cinco horas, a mistura de ligação é utilizada para transformar *E. coli* JM83 competente (Maniatis *et al.*, *supra* (1982)).

Os métodos descritos em Maniatis *et al.*, *supra*, são utilizados para preparar o ADNc necessário: em resumo, os

métodos são como se segue. Os transformantes são seleccionados, plaqueando a *E. coli* em placas de ágar contendo ampicilina. As colónias resistentes a ampicilina são crescidas individualmente em cultura líquida e o ADN é preparado utilizando o método miniprep de lise alcalina. A presença do ADNc da cadeia pesada de MHC e a sua orientação no vector são determinadas por mapeamento com enzimas de restrição. As bactérias que contêm o vector com o ADNc na orientação correcta, em relação ao promotor de metalotioneína, são utilizados para a preparação de ADN em grande escala, utilizando o método de lise alcalina e purificação com gradiente de cloreto de cézio. A quantidade de ADN obtida é determinada espectrofotometricamente.

D. Transfecção e marcação de células Schneider

As células Schneider II são crescidas em meio de Schneider (Gibco/BRL, Grand Island, NY) suplementado com soro fetal de vitela a 10% (tratado pelo calor durante uma hora, a 55°C), penicilina 100 unidades/ml, estreptomicina 100 mg/ml e glutamina 1 mM. (Para conveniência, este meio suplementado é daqui para a frente referido como meio de Schneider). As células são crescidas a 27°C e tipicamente passadas a cada sete dias, por diluição 1:17 em meio fresco. As células são convertidas para crescimento em meio isento de soro (Excell 400 ou 401 suplementado com penicilina 100 unidades/ml, estreptomicina 100 mg/ml, glutamina 1mM e G418 500 µg/ml (JRH Biosciences, Lenexa, KS) por diluição inicial a Schneider a 50%/Excell 401 a 50%. Uma semana mais tarde, as células podem ser passadas para meio de Schneider a 10%/Excell 401 a 90% e uma semana mais tarde para Excell 401 a 100%. As células são mantidas neste meio e passadas a cada sete dias, por diluição 2:17 em meio fresco.

Plaqueiam-se 15×10^6 células Schneider a uma concentração de 10^6 células por ml, em placas de petri de 85 mm. Doze horas mais tarde, adicionam-se gota a gota às células, precipitados de fosfato de cálcio/ADN, preparados como descrito a seguir (1 ml). Após 48 horas, o sobrenadante é cuidadosamente removido e as células são transferidas para um frasco de 175 cm², num volume total de 50 ml em meio de Schneider, contendo 500 µg/ml de Geneticina (G418) (Gibco/BRL,

Grand Island, NY). Após 21 dias, removem-se 20 ml de cultura para um frasco fresco contendo 30 ml de meio de Schneider contendo G418 500 $\mu\text{g/ml}$. Dez dias mais tarde, obtém-se uma população de células estável que aderiu fracamente ao frasco e cresceu com um tempo de duplicação de aproximadamente 24 horas e estas células são subsequentemente cultivadas e passadas no meio de selecção, como descrito acima. Preparam-se alíquotas congeladas destas células, recolhendo $5-20 \times 10^6$ células por centrifugação e ressuspendendo-as em 1 ml de meio de congelação de células (soro fetal de vitela a 93%/dimetilsulfóxido a 7%). As alíquotas são então colocadas a -70°C durante uma semana e subsequentemente transferidas para armazenamento em azoto líquido.

Os precipitados de fosfato de cálcio são preparados como descrito em Paabo *et al.* (EMBO J 5:1921-27 (1986)), excepto que se utilizam 25 μg de ADN para transfecção. As combinações seguintes de ADN são utilizadas para preparar o transfectante indicado:

(a) cadeia pesada de MHC de Classe I sozinha: 23 μg do ADN do vector de expressão da cadeia pesada + 2 μg de ADN de phshsneo.

(b) cadeia pesada de MHC de Classe I + microglobulina $\beta 2$: 11,5 μg do ADN do vector de expressão de cadeia pesada + 11,5 μg do ADN do vector de expressão de microglobulina $\beta 2$ (humano e ratinho) + 2 μg de ADN de phshsneo.

Vinte e quatro horas antes da marcação metabólica, as células são plaqueadas a uma densidade celular de $3-5 \times 10^6$ células/ml (10 ml/placa de petri de 85 mm) em meio de Schneider contendo CuSO_4 1mM. Trinta minutos antes da marcação, o meio é aspirado das placas e as células são lavadas com 2×10 ml de PBS e em seguida incubadas em meio de insecto de Grace menos metionina e cisteína (encomenda especial da Gibco/BRL, Grand Island, NY) durante 20 minutos e em seguida em 1 ml deste meio contendo 0,1 mCi de marcador ^{35}S Trans (New England Nuclear, duPont, Boston, MA). Após o período de marcação, a solução de marcação é aspirada e as células são, ou lisadas imediatamente em gelo, com PBS

arrefecido em gelo/Triton X100 a 1% (1 ml) ou após um período de "chase" na presença de meio Schneider ou Excell 400 contendo metionina (5 ml) (JRH Biosciences). O meio de "chase" é recolhido quando se pretendem analisar moléculas de MHC de Classe I solúveis.

As seguintes operações são todas realizadas com os lisados mantidos frios (menos de 8°C). Os lisados foram recolhidos em tubos Eppendorf, centrifugados num tubo de microcentrífuga durante 15 minutos a 13000Xg, transferidos para um tubo fresco contendo 100 µl de uma lama de proteína A Sepharose e colocados num agitador topo-a-topo, durante duas horas. Após nova centrifugação na microcentrífuga, durante 15 minutos, os lisados celulares estão prontos para análise.

Nas experiências utilizando MHC de murídeo, transfectaram-se células Schneider 2 com os recombinantes de MHC de murídeo descritos acima, utilizando o método de precipitação com CaPO₄; cada cadeia pesada é transfectada ou sozinha, ou como uma mistura 50:50 com o vector que codifica para a microglobulina β2. Um plasmídeo que codifica para resistência à neomicina, ADN de phshsneo, é incluído em cada transfecção, de modo que foi possível obter uma população de células que expressa de forma estável o MHC de Classe I, por crescimento dos transfectantes em meio de selecção (sulfato de Geneticina G418, Gibco/BRL, Grand Island, NY).

E. Produção de péptidos

Os péptidos antigénicos de acordo com a presente invenção podem ser obtidos a partir de fontes que ocorrem naturalmente, ou podem ser sintetizados utilizando métodos conhecidos. Em vários exemplos aqui descritos, os péptidos são sintetizados num sintetizador da Applied Biosystems, ABI 431A (Foster City, CA) e subsequentemente purificados por HPLC. Os péptidos antigénicos utilizados em várias experiências aqui descritas incluem os enumerados a seguir.

Ovalbumina (8) ¹	Código de 1 letra: SIINFEKL;
Cód. de 3 letras:	SerIleIleAsnPheGluLysLeu
(SEQ ID NO 23) (resíduos 5-12)	
Ovalbumina(24) ¹	Código de 1 letra: EQLESIINFEKLEWTSSNVMEER;
Cód. de 3 letras:	GluGlnLeuGluSerIleIleAsnPheGluLysLeuThrGluTrpThrSerSerAsnValMetGluGluArg
(SEQ. ID NO 23)	
VSV NP ²	Código de 1 letra: RGYVYQGL
Cód. de 3 letras:	ArgGlyTyrValTyrGlnGlyLeu
(SEQ ID NO 24)	
Influenza NP ²	Código de 1 letra: ASNENMETM
Cód. de 3 letras:	AlaSerAsnGluAsnMetGluThrMet
(SEQ ID NO 25)	
LCMV NP ³	Código de 1 letra: SERPQASGVYMGNL
Cód. de 3 letras:	SerGluArgProGlnAlaSerGlyValTyrMetGlyAsnLeu
(SEQ ID NO 26)	
LCMV GP2 ⁴	Código de 1 letra: DSSGVENPGGYCTK
Cód. de 3 letras:	AspSerSerGlyValGluAsnProGlyGlyTyrCysThrLys
(SEQ ID NO 27)	
HIV GAG A (9) ⁵	Código de 1 letra: QMKDCTERQ
Cód. de 3 letras:	GlnMetLysAspCysThrGluArgGln
(SEQ ID. NO 28)	
HIV GAG B (9) ⁵	Código de 1 letra: KRWIILGLN
Cód. de 3 letras:	LysArgTrpIleIleLeuGlyLeuAsn
(SEQ ID NO 29)	
HIV Vpr (9) ⁵	Código de 1 letra: FRIGCRHSR
Cód. de 3 letras:	PheArgIleGlyCysArgHisSerArg
(SEQ ID NO 30)	
HIV POL (9) ⁵	Código de 1 letra: ILKEPVHGV
Cód. de 3 letras:	IleLeuLysGluProValHisGlyVal
(SEQ ID NO 31)	
INF Matrix (10) ⁶	Código de 1 letra: ILGFVFTLTV
Cód. de 3 letras:	IleLeuGlyPheValPheThrLeuThrVal
(SEQ ID NO 32)	

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

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

³ Whitton, *et al.*, *J. Virol.* 63: 4303-10 (1989)

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

⁵ Nixon e McMichael, *AIOS* 5: 1049 (1991); veja-se também Nixon, *et al.*, *AIDS*:4 841-5 (1990).

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

O isolamento ou síntese de péptidos “ao acaso” pode também ser adequado, particularmente quando se tenta determinar um epítipo particular, de modo a carregar uma molécula de MHC vazia, com um péptido que mais provavelmente estimule células CD8 precursoras. Pode-se produzir uma mistura de péptidos “ao acaso” através da utilização de proteossomas (veja-se, e.g. Exemplo 2.B.6), ou submetendo uma proteína ou polipéptido a um processo degradativo - e.g. digestão com quimotripsina - ou os péptidos podem ser sintetizados. Apesar

de termos observado que as linhas celulares da presente invenção são capazes de degradar proteínas e polipéptidos em péptidos menores, capazes de ser carregados em moléculas de MHC de Classe I, é preferível introduzir péptidos menores - e.g. 8-meros e 9-meros - directamente na cultura de células, para facilitar um carregamento e processo de expressão mais rápidos.

Quando se sintetizam péptidos, e.g. péptidos de 8-, 9- e 18 aminoácidos ao acaso, todas as variedade de aminoácidos são preferencialmente incorporadas durante cada ciclo de síntese. Deve ter-se em conta, no entanto, que vários parâmetros - e.g. incompatibilidade de certos aminoácidos com o solvente - podem resultar numa mistura que contém péptidos sem alguns aminoácidos. O processo deverá assim ser ajustado como necessário - i.e. alterando solventes e condições reaccionais - para produzir a maior variedade de péptidos.

De modo a determinar "preferências" na selecção de péptidos pelas moléculas de MHC, uma série de péptidos de diferentes comprimentos foi, portanto, sintetizada, como se mostra na tabela 3. Estes incluem péptidos de 8 e 9 aminoácidos de comprimento, bem como péptidos maiores. De modo a quantificar a quantidade de termoestabilidade conferida pelos péptidos de diferentes tamanhos e por diferentes microglobulinas $\beta 2$, analisou-se a estabilidade destas várias moléculas nos lisados celulares. Os lisados de células radioactivos foram preparados a partir de células de *Drosophila* que expressam $K^b/\beta 2$, $L^d/\beta 2$ e $D^b/\beta 2$, ou com microglobulina $\beta 2$ de murídeo ou humana, como anteriormente descrito. Os lisados foram então divididos em alíquotas e fizeram-se adições como descrito. Para cada tratamento, prepararam-se cinco tubos; estes forma então incubados a diferentes temperaturas entre 4°C e 47°C, durante 1 hora, após o que se imunoprecipitou a Classe I e analisou-se por SDS-PAGE. Os autorradiogramas foram então varridos com um densitómetro laser e a quantidade de sinal foi representada graficamente, em função da temperatura de incubação à qual a amostra foi submetida. A temperatura a que 50% das moléculas são estáveis foi calculada a partir do gráfico e foi utilizada como uma medida das termoestabilidades relativas das diferentes espécies. Como referido acima, as cadeias pesadas

de murídeo complexadas com microglobulina $\beta 2$ humana, eram estáveis a temperaturas de aproximadamente 6-8 graus mais elevadas do que quando complexadas com $\beta 2$ de murídeo. Também se observou que as estabilidades conferidas pelos péptidos e microglobulina $\beta 2$ xenogénica eram aditivas. Um grande aumento na termoestabilidade das moléculas de Classe I ocorre quando os 8-9-meros são utilizados, em comparação com os 12-25-meros; de facto, a diferença entre a estabilização conferida pelos 8-9-meros em comparação com péptidos maiores, pode mesmo ser maior do que a que se observou anteriormente, pois mesmo apesar dos péptidos terem sido purificados por HPLC, é provável que haja alguma contaminação dos péptidos maiores pelos 8-9-meros.

Verifica-se agora que a termoestabilidade de uma molécula de Classe I é aparentemente dependente de: (1) origem da microglobulina $\beta 2$; (2) presença do péptido; e (3) comprimento e sequência deste péptido.

F. Produção de MHC expresso na superfície, termoestável

1: Refinamento dos parâmetros utilizando MHC de murídeo

Antes da experimentação com células que expressam moléculas de MHC de Classe I, humanas, fez-se a optimização de vários parâmetros utilizando MHC de murídeo. Primeiro, verificou-se que as moléculas de MHC de Classe I de murídeo expressas em células de *Drosophila*, têm características de moléculas de Classe I isentas de péptidos ou "vazias".

Por exemplo, as Figuras 2A e B mostram resultados de testes preparados a partir de células de *Drosophila* que expressam $K^b/\beta 2$, $L^d/\beta 2$ e $D^b/\beta 2$, quer com microglobulina $\beta 2$ de murídeo, quer de humano. As células de *Drosophila* que expressam $K^b/\beta 2$, $L^d/\beta 2$ e $D^b/\beta 2$ foram marcadas durante 45 minutos com 35S metionina e os lisados foram preparados como descrito acima. Cada lisado foi dividido em quatro alíquotas, às quais se adicionou, ou péptido OVA, ou NP ou GP2, ou nenhum péptido. Após incubação de uma hora a 4°C, o outro foi incubado durante uma hora a 30°C. As moléculas de Classe I foram então imunoprecipitadas a partir dos lisados e analisadas por SDS-PAGE. Ocorreu uma estabilização drástica de

K^b/β2 ao desafio de temperatura, quer quando se adicionou péptido OVA, quer NP aos lisados; de modo semelhante, o L^d/β2 foi estabilizado por adição do péptido NP. O D^b/β2 não parece ser tão lábil à temperatura como as outras duas molécula; apesar de tudo, observa-se um aumento na estabilidade da molécula por adição do péptido GP2 ao lisado, enquanto que a adição do péptido OVA ou NP não o faz. Podem ver-se duas bandas imunoprecipitadas para cada Classe I, representando as formas de Golgi processadas (inferior) ou não processadas, parecendo ambas as moléculas igualmente bem estabilizadas por adição do péptido ao lisado. A pequena quantidade de proteína "resistente a 30°C" observada nos lisados de K^b/β2 não tratados ou tratados com GP2 é ruído de fundo, dado que a adição de Y3 a um lisado de células L^d/β2 marcadas resulta no isolamento desta banda (não apresentado).

Em seguida, analisou-se a possibilidade de a microglobulina β2 humana ser melhor que a microglobulina β2 de murídeo em termoestabilizar as cadeias pesadas de murídeo. Verificou-se que a adição de β2 humana a células de *Drosophila* crescidas em meio Excell 400, não só aumentou o nível de estado estacionário de todas as três moléculas de Classe I de murídeo, mas tornou também as moléculas estáveis a 37°C, durante pelo menos três horas. A maior estabilidade da Classe I de murídeo, por adição de β2 humana poderá ter sido o resultado de aumentar a concentração de β2 no meio; esta possibilidade foi eliminada. O ADNc que codifica para microglobulina β2 humana foi clonado no vector de expressão de *Drosophila* pRmHa-3 e co-transfectado com plasmídeos de expressão contendo os vários ADNc de cadeia pesada de Classe I de murídeo e o plasmídeo do marcador de resistência, como descrito anteriormente. Após selecção com G418, as células foram coradas com os anticorpos anti-Classe I adequados para expressão de superfície. As células com uma expressão forte foram seleccionadas utilizando FACS. Obtiveram-se populações de células estáveis (dados não apresentados). As células foram em seguida condicionadas a crescer em Excell 400 e incubadas durante períodos de tempo diferentes, a 37°C. As moléculas de Classe I de ratinho sintetizadas com microglobulina β2 humana eram estáveis a uma incubação de 3 horas a 37°C, sem adição de β2 exógeno ao meio Excell (dados não apresentados). Os nossos

resultados indicam que a termoestabilidade das moléculas de Classe I de murídeo depende da presença de péptido e da origem da microglobulina $\beta 2$ (Veja-se Figuras 3A e 3B).

Adicionalmente, determinou-se agora que as moléculas de Classe I expressas na superfície celular são ainda estabilizadas pela adição de péptidos de tamanho adequado. (Vejam-se Figuras 5A-C). Sintetizou-se uma série de péptidos de diferentes comprimentos, como se pode ver na Tabela 3 (veja-se Exemplo 5.2). Estes incluem um péptido que tem 8 aminoácidos de comprimento; o RGYVYQGL (SEQ ID NO 24) foi caracterizado como o epítipo na proteína G do vírus de estomatite vesicular (VSV). De modo semelhante, o péptido 8-mero de OVA SIINFEKL (SEQ ID NO 23, resíduos 5-12) foi identificado como o péptido da ovalbumina que é apresentado por $K^b/\beta 2$ e o péptido de 9 aminoácidos de comprimento ASNENMETM (SEQ ID NO 25) foi caracterizado como o epítipo da proteína nuclear do vírus de influenza, apresentado por $D^b/\beta 2$. A adição deste péptidos "progenitores" a células de *Drosophila* cultivadas em Excell e que expressam Classe I de murídeo, resultou numa termoestabilidade a 37°C de $K^b/\beta 2$, pelo péptido OVA e de $D^b/\beta 2$, pelo péptido NP.

De modo a quantificar a quantidade de termoestabilidade conferida pelos péptidos de diferentes tamanhos e pelas diferentes microglobulinas $\beta 2$, analisou-se a estabilidade destas várias moléculas em lisados celulares. Prepararam-se lisados celulares radioactivos a partir de células de *Drosophila* que expressam $K^b/\beta 2$, $L^d/\beta 2$ e $D^b/\beta 2$, quer com microglobulina $\beta 2$ de murídeo, quer humana, como anteriormente descrito. Os lisados foram então divididos em alíquotas e fizeram-se adições como descrito no Exemplo 1.D. Para cada tratamento, prepararam-se 5 tubos; estes foram então incubados a diferentes temperaturas entre 4°C e 47°C, durante uma hora, após o que as Classe I foram imunoprecipitadas e analisadas por SDS-PAGE. Os autorradiogramas foram então varridos com um densitómetro laser e a quantidade de sinal foi representada graficamente, em função da temperatura de incubação à qual essa amostra tinha sido submetida. A temperatura à qual 50% das moléculas são estáveis foi calculada a partir do gráfico e foi utilizada como uma medida da termoestabilidade relativa

das diferentes espécies. Como anteriormente observado, as cadeias pesadas de murídeo complexadas com microglobulina $\beta 2$ humana eram estáveis a temperaturas de aproximadamente 6-8 graus mais elevadas, se complexadas com $\beta 2$ de murídeo. É interessante notar que as estabilidades conferidas pelo péptido e microglobulina $\beta 2$ xenogénica são aditivas. Um grande aumento na termoestabilidade das moléculas de Classe I ocorre quando se utilizam 8-9-meros, em comparação com os 12-25-meros; de facto a diferença entre a estabilização conferida pelos 8-9-meros, em comparação com os péptidos maiores, poderá ser ainda maior do que a que se observou anteriormente, pois mesmo apesar de os péptidos terem sido purificados por HPLC é provável que haja alguma contaminação dos péptidos maiores pelos 8-9-meros.

A tabela seguinte mostra as temperaturas (em °C) a que 50% das cadeias pesadas de MHC de Classe I (indicadas) são estáveis nos lisados TX100, quando co-expressas com $\beta 2$ de murídeo ou humana, na presença ou ausência de péptidos.

Tabela 1

MHC de Classe I	Péptido	$\beta 2$ de ratinho	$\beta 2$ humana
H2-K ^b	--	24	32
	OVA 8	45	47
	OVA 9	46	48
	VSV 8	26	34
H2-D ^b	--	27	34
	INF NP9	42	44
H2-L ^d	--	23	29

De modo a responder à questão de o péptido poder ou não ligar-se a moléculas de Classe I vazias, na ausência de microglobulina $\beta 2$, prepararam-se lisados, utilizando detergente, de células de *Drosophila* que expressam cadeias pesadas de Classe I K^b ou D^b, marcadas com ³⁵S metionina, durante uma hora e estes foram tratados. A molécula K^b foi imunoprecipitada com o anticorpo Y3 e a D^b com o anticorpo B22.249. Apenas foi possível detectar níveis baixos de cadeia pesada de K^b imunorreactiva nos lisado não tratados. A adição de qualquer dos péptidos que se liga à Classe I ou à

microglobulina $\beta 2$ humana, resulta num aumento da quantidade de material imunorreactivo; a adição de ambos resultou numa quantidade muito maior de cadeia pesada imunoreactiva. Obtiveram-se resultados semelhantes para D^b . Assim, parece que a cadeia pesada pode ligar um péptido na ausência de microglobulina $\beta 2$, no entanto, ou esta ligação não resulta numa conformação muito estável, ou os anticorpo utilizados não se ligam bem a esta conformação. A adição de microglobulina $\beta 2$ também conduz a um aumento no número de moléculas imunorreactivas, presumivelmente pelo mesmo motivo. Os efeitos destes dois reagentes são aditivos, sugerindo que o complexo triplo é a forma de molécula mais estável e/ou que esta molécula é a que é melhor reconhecida pelo anticorpo.

Estes resultados levantam a questão de saber se é possível "reconstruir" complexos de cadeia pesada/ $\beta 2$ a partir de lisados, após tratamento a uma temperatura de 30°C . Trataram-se lisados de células de *Drosophila* que expressam $K^b/\beta 2$, durante uma hora, a 30°C , após o que se adicionou péptido NP e microglobulina $\beta 2$ humana. Após incubação a 4°C , durante 4 horas, as cadeias pesadas de Classe I foram imunoprecipitadas, ou com Y3, ou com o anticorpo anti-cauda citoplasmática K193. A preparação dos anti-soros é descrita no Exemplo 2.1.

Como anteriormente referido, verificou-se que o tratamento de temperatura de moléculas de Classe I vazias em lisados obtidos com Triton TX-100, não resultou na sua degradação (a molécula K^b pode ser imunoprecipitada igualmente bem após o tratamento a 30°C , com um anticorpo anti-cauda citoplasmática K193), mas, em vez disso, resultou na sua desnaturação. Além disso, a conformação assumida por estas moléculas desnaturadas pelo calor é tal, que elas não mais ligam a microglobulina $\beta 2$, nem podem ser recuperadas em moléculas que são reconhecidas por Y3, por adição do péptido e microglobulina $\beta 2$ humana. Assim, é razoável concluir que as cadeias pesadas de Classe I podem ligar o péptido, quer sozinhas, quer quando complexadas com microglobulina $\beta 2$.

A expressão na superfície, de MHC de Classe I humano, carregado com péptido, no entanto, parece ser melhor

facilitada carregando as moléculas com péptido após as cadeias pesadas se terem complexado com microglobulina $\beta 2$.

2. Expressão de MHC humano

Após termos determinado que a termoestabilidade de uma molécula de Classe I depende da origem da microglobulina $\beta 2$, da presença de péptido e do comprimento e sequência deste péptido, utilizámos esta informação na criação de linhas celulares capazes de activar especificamente células CD8, através da expressão de moléculas de MHC de Classe I humanas, carregadas com péptido.

A termolabilidade parece ser uma propriedade inerente às moléculas de Classe I; evoluiu provavelmente para assegurar que as moléculas de Classe I que contêm, ou nenhum péptido, ou um péptido de propriedades de ligação fracas (que confere pouca termoestabilidade) se auto-destroem. Deste modo, a célula minimiza o número de moléculas de Classe I na sua superfície, pois uma situação destas seria presumivelmente perigosa, na medida em que péptidos derivados exogenamente poderiam ser ligados e apresentados. As moléculas de Classe I humanas (B27 e A2.1) expressas em células de insecto com $\beta 2$ humana, não são estáveis para se alargar a incubação a 37°C: nem o são as moléculas de Classe I humanas, expressas na linha celular mutante T2, que se verificou ser deficiente no carregamento de péptidos em moléculas de Classe I (Hosken e Bevan, Science 248:367-80 (1990); Cerundolo *et al.*, Nature 345:449-452 (1990)). Assim, parece que a afinidade entre a cadeia pesada e a microglobulina $\beta 2$ foi cuidadosamente conservada ao longo da co-evolução das moléculas, de modo que as moléculas de Classe I vazias, ou as que transportam péptidos fracamente ligados, se auto-destroem à temperatura corporal do organismo "hospedeiro".

As moléculas de MHC de Classe I humanas, foram expressas em células Schneider. As linhas celulares que co-expressam microglobulina $\beta 2$ humana e HLA A2.2Y, HLA A2.2, HLA B7 ou HLA B27 foram estabilizadas utilizando métodos anteriormente descritos. Em resumo, os ADNc que codificam para as proteínas acima foram clonados no vector de expressão de *Drosophila*, pRmHa-3 e co-transfectadas com um plasmídeo contendo

microglobulina $\beta 2$ humana e o plasmídeo phshsneo, em células Schneider, através de métodos aqui descritos. Três a quatro semanas mais tarde, a população de células resistentes a G418 foi diluída a 1:5 com meio de selecção fresco. Quando se obteve uma população de células em crescimento, saudável, adicionou-se CuSO_4 a uma alíquota de células e 24 horas mais tarde, as células foram analisadas por citometria de fluxo, utilizando um anticorpo monoclonal W6/32 (ATCC HB95, Bethesda MD), que reconhece um determinante monomórfico das cadeias pesadas de Classe I humanas, quando estão em associação com microglobulina $\beta 2$ (Veja-se Barnstable *et al.*, Cell 14:9 (1978)). Induziram-se níveis elevados de expressão de superfície de cada uma das moléculas de Classe I humanas por adição de CuSO_4 (dados não apresentados). Estas populações estáveis foram seleccionadas quanto a células com expressão elevada, utilizando citofluorimetria como descrito mais à frente. São estas populações de células seleccionadas que são utilizadas em todas as experiências subsequentes.

Vinte e quatro horas antes da análise FACS, adiciona-se CuSO_4 às células Schneider transfectadas de forma estável ($3-4 \times 10^6$ células/ml) a uma concentração final de 1 mM, "ligando" assim a expressão dos genes transfectados. As células são plaqueadas em placas de conjuntos de 24 poços (2 ml por poço). Oito horas antes da análise FACS, o meio de CuSO_4 é substituído com meio fresco (1 ml), com ou sem péptido, a uma concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$. Fazem-se desafios de temperatura a 37°C , transferindo as placas para uma superfície plana num compartimento a 37°C , a vários intervalos de tempo antes da recolha das células para análise.

Para analisar a expressão de superfície de MHC de Classe I em células Schneider, transferem-se alíquotas de células (5×10^5) para tubos em gelo, recolhem-se por centrifugação (1000Xg durante 4 minutos), ressuspendem-se em 3 ml de PBS/BSA a 1%, azida de sódio a 0,02%; recolhem-se por centrifugação e ressuspendem-se em PBS/BSA (0,5 ml) contendo o anticorpo primário adequado (fluido de ascitos Y3, 28:14:8S, 30.5.7, W6/32 diluído 1:200). Os anti-soros de coelho são utilizados a 1:500 e o sobrenadante do hibridoma B22.293 é utilizado directamente. Após um hora de incubação em gelo, as células são lavadas duas vezes em 3 ml de PBS/BSA e

ressuspensas em 0,5 ml de PBS/BSA contendo anticorpo secundário marcado com FITC (Cappel, Durham, NC) e 1 mg/ml de iodeto de propídio. Após 30 minutos de incubação em gelo, as células são lavadas uma vez com PBS/BSA e ressuspensas neste tampão a uma concentração de $\times 10^6$ /ml. As amostras são então analisadas por FACS 440 (Becton Dickinson). As células mortas coradas com iodeto de propídio são excluídas, incluindo um portão vivo na análise.

Para a selecção de células, utiliza-se o mesmo processo descrito acima, excepto que todas as operações de coloração são realizadas num hote estéril. As soluções, incluindo anticorpos, são esterilizadas por filtração e utiliza-se meio de Schneider ou Excel 400 em vez de PBS/BSA. As células que se ligam especificamente ao anticorpo primário são seleccionadas utilizando um seleccionador de células Becton Dickinson. As células seleccionadas ($2-8 \times 10^5$) são lavadas em meio, antes de serem plaqueadas a uma concentração de 2×10^5 células/ml.

De modo a demonstrar que as moléculas de Classe I humanas expressas na superfície das células de *Drosophila* estavam vazias, as células foram incubadas a 37°C durante duas horas e a expressão de superfície celular foi analisada por citofluorimetria. A expressão de superfície de ambos, HLA B27 e A2.1 é grandemente reduzida quando as células são incubadas a 37°C durante 2 horas; no entanto, a pré-incubação das células em péptidos de HIV que se sabe que se ligam a moléculas de Classe I, confere uma estabilidade térmica significativa à Classe I, enquanto que os péptidos que não se ligam têm pouco efeito (veja-se Figura 5A). (um péptido de 9 aminoácidos ILKEPVHGV (SEQ ID NO 31) da proteína POL de HIV liga-se e estabiliza o HLA A2.1. Um péptido de 9 aminoácidos da proteína Vpr de HIV liga-se e estabiliza o B27 (FRIGCRHSR; SEQ ID NO 30). Estes dados mostram que as moléculas de Classe I humanas expressas na superfície de células de *Drosophila* estão vazias e podem ser estabilizadas por ligação de péptidos de HIV específicos.

A Figura 5A mostra a termoestabilização induzida por péptidos, de HLA B27 e HLA A2.1 expressos na superfície de células de *Drosophila*, por péptidos de HIV. As células de *Drosophila* que expressam, quer HLA B27, quer A2.1, foram

incubadas com péptidos quando indicado e em seguida foram, ou mantidas a 28°C, ou incubadas a 37° durante duas horas, antes de análise da expressão de superfície das moléculas de Classe I, utilizando o anticorpo W6/32 (da ATCC HB95) e citofluorometria. A fluorescência média de cada população de células é representada graficamente em função das condições de incubação. O péptido POL de HIV (ILKEPVHGV SEQ ID NO 31) estabiliza o A2.1, mas não o B27, enquanto que o péptido Vpr de HIV (FRIGCRHSR, SEQ ID NO 30) estabiliza o B7, mas não o A2.1.

A figura 5B mostra que o HLA A2.2Y expresso em células de *Drosophila*, tem as características de moléculas de Classe I vazias em lisados obtidos com Triton X100. Os lisados obtidos com Triton X100, radioactivos, preparados a partir de células de *Drosophila* que expressam A2.2Y, foram divididos em alíquotas e fizeram-se adições de péptidos como se segue: A e B: nenhuma adição; C: um péptido GAG de HIV (B) KRWIILGLN (SEQ ID NO 29); D: péptido de influenza ILGFVFTLTV (SEQ ID NO: 32); E: péptido 8-mero ao acaso; F: péptido 9-mero ao acaso. Incubaram-se alíquotas B-F a 37°C durante um período de uma hora antes da imunoprecipitação com W6/32 e análise por SDS-PAGE.

A Figura 5C mostra que o HLA B7 expresso em células de *Drosophila* tem as características de moléculas de Classe I vazias em lisados obtidos com Triton X100. Os lisados foram preparados como na fig. 5B, em células de *Drosophila* que expressam HLA B7. As alíquotas não receberam nenhum péptido (-P), ou receberam péptidos 18-meros ou 9-meros ao acaso, como indicado. Metade das alíquotas foram incubadas a 39°C durante uma hora, antes da imunoprecipitação com W6/32 e SDS PAGE.

Também se verificou que o HLA B7 e A2.2Y expressos em células de *Drosophila* estão vazios, na medida em que se verificou que eram termolábeis em lisados de células obtidos com Triton X100 (veja-se Fig. 5B e 5C); no entanto, foi possível estabilizá-los por adição de péptidos aos lisados, antes do desafio de temperatura. Em particular, pode verificar-se que um 10-mero derivado da matriz de influenza, ILGFVFTLTV (SEQ ID NO 32) (Gotch et al., J. Exp. Med.

168:2045-57 (1988)), estabiliza o HLA A2.2, tal como o faz um péptido 9-mero que também estabiliza o HLA B7.

O teste de desafio de temperatura de lisados celulares obtidos com Triton X100, foi realizado como anteriormente descrito para Classe I de murídeo. A conclusão destes estudos é que as moléculas de Classe I humanas, expressas em células de *Drosophila* têm todas as características das moléculas vazias expressas na linha celular humana, mutante T2 (Salter, *et al.*, *supra* (1985); Hosken e Bevan, *supra* (1990)).

Exemplo 2

Produção de péptidos com características de ligação óptimas a moléculas de Classe I

A. Discussão e apreciação global

Dados recentes demonstraram que as moléculas de Classe I se ligam a péptidos que contêm motivos de sequência de consenso (Veja-se Falk *et al.*, Nature 351:290-6 (1991); Van Bleek e Natheson, Nature 348:213-6 (1990). Assim, os resíduos de terminal-amino e carboxilo, de péptidos ligados a uma determinada forma alélica da molécula de Classe I, parecem estar restritos a alguns tipos de aminoácidos e um ou mais resíduos internos poderão ter de ocupar posições específicas. Adicionalmente, os comprimentos totais de péptidos ligados a Classe I parecem ser confinados a 8 ou 9 resíduos de aminoácidos. Falk *et al.*, *supra* (1991); Van Bleek e Natheson, *supra* (1990). A análise da ligação dos péptidos à molécula K^b de murídeo confirma que um péptido de ovalbumina, OVA-8 com a sequência SIINFEKL (SEQ ID NO 23, resíduos 5-12), que se liga a moléculas K^b *in vivo*, contém um motivo de ligação óptima e liga-se fortemente a moléculas K^b *in vitro*. Dado que esta sequência de péptido na molécula de ovalbumina é flanqueada pelas sequências ...QLE e TEW..., é de esperar que, ou várias proteases, uma protease com uma especificidade muito ampla para substratos, ou um complexo enzimático com actividades proteolíticas múltiplas, deve ser responsável por gerar o péptido OVA-8 a partir de ovalbumina intacta.

Para analisar se os proteossomas isolados podem produzir o péptido óptimo para ligação a moléculas K^b, foi útil tirar

partido da verificação de que as moléculas K^b de Classe I "vazias", i.e. sem péptido ligado, são muito termolábeis (Ljunggren *et al.*, *supra* (1990)). A incubação de moléculas K^b "vazias" em detergente, a 30°C, durante uma hora, torna o anticorpo Y3 específico de K^b , dependente de β 2M incapaz de reagir com a molécula K^b , pois o β 2M dissocia-se rapidamente da cadeia pesada. A ligação de um péptido adequado, tal como OVA-8, previne a dissociação da subunidade, permitindo que o Y3 se ligue ao complexo de Classe I. Os péptidos com o mesmo comprimento que o OVA-8, que não pode ser apresentado pelas moléculas K^b *in vivo* (e.g. o péptido SNENMETM (SerAsnGluAsnMetGluThrMet) (SEQ ID NO 25, resíduos 2-9) que se liga a D^b , Townsend *et al.* Cell 44:959-968 (1986)) eram incapazes de prevenir a dissociação induzida pelo calor, das moléculas K^b de Classe I (veja-se Fig. 3). O péptido OVA-24 com a sequência EQLESIINFEKLTEWTSSNVMEER (SEQ ID NO 23) (que inclui a sequência de OVA-8, mostrada em sublinhado) liga-se fracamente a moléculas K^b . No entanto, a ligação fraca de OVA-24 não foi suficiente para prevenir que o complexo K^b - β 2M se dissociasse a 30°C.

Os vários anti-soros utilizados foram preparados como se segue. O anti-soro K193 é produzido imunizando coelhos com linfocianina de lapa *Fissurella* (Calbiochem, La Jolla, CA) conjugada com o péptido sintético que corresponde à sequência de terminal COOH de $H-2K^b$ (LPDCKVMVHDP SLA ou LeuProAspCysLysValMetValHisAspPro-SerLeuAla) (SEQ ID NO 33). Preparam-se ascitos de Y3 utilizando o hibridoma HB176 (ATCC, Rockville, MD) (Veja-se também Hammerling *et al.*, PNAS USA 79:4737-4741 (1982)). Os ascitos de 28-14-8S são preparados a partir do hibridoma HB 27 (ATCC, Rockville, MD) (Veja-se Ozato e Sachs, J. Immunol. 126:317-321 (1980); Myers *et al.*, J. Immunol. 142:2751-58 (1989)). Os ascitos de 30-5-7 são preparados a partir do sobrenadante da cultura do hibridoma B22.249 (Veja-se Hammerling *et al.*, Immunogenetics 8: 433-445 (1979); Allen, *et al.*, Nature 309:279-81 (1984)). Os anti-soros policlonais contra MHC de murídeo, purificado, são preparados de acordo com Kvist *et al.*, Scand. J. Immunol. 7:265-76 (1978). Os anticorpos secundários marcados com FITC (IgG de cabra anti-ratinho e de cabra anti-coelho, purificado por afinidade) são obtidos da Cappell (Durham, NC).

Utilizando este sistema de teste, as moléculas K^b "vazias" marcadas biossinteticamente a partir de células RMA-S, que não conseguem carregar os péptidos em moléculas de Classe I, foram incubadas com o anticorpo monoclonal Y3, específico de K^b , dependente de β 2M. As moléculas ligadas a anticorpo foram separadas por SDS-PAGE e visualizadas por autorradiografia. A análise de SDS-PAGE é realizada como se segue. Os imunoprecipitados recolhidos por pérolas de proteína A Sepharose são lavadas cinco vezes com 1 ml de TX100 a 0,1%/PBS e imediatamente fervidas em tampão de amostra de SDS-PAGE, ou, quando indicado, após digestão de metade da amostra com Endoglicosidase H (veja-se Jackson *et al.*, EMBO J. 9:3153-3162 (1990)). As amostras são então analisadas em geles de SDS-PAGE com gradiente a 10-15%, que são tratados com Amplify (Amersham, Arlington Heights, IL) antes da autorradiografia a -70°C , utilizando uma película Xomat AR da Kodak (Rochester, NY).

As bandas correspondentes à cadeia de K^b foram quantificadas por densitometria. Para produzir os dados (não apresentados), o lisado de células RMA-S contendo a molécula K^b de Classe I "vazia", foi incubado com péptido e/ou proteossomas purificados, antes de incubação, quer a 4°C , quer a 30°C , durante uma hora. As moléculas K^b foram imunoprecipitadas com o anticorpo monoclonal Y3 e analisadas por SDS-PAGE. As moléculas K^b "Vazias" foram incubadas com OVA-24; apenas com proteossomas; OVA-24 e proteossomas; OVA-24, proteossomas e p-hidroximercuriobenzoato; e OVA-8. O lisado contendo K^b "vazios", sozinho, foi analisado (dados não apresentados). Antes da imunoprecipitação, as amostras foram desafiadas com temperaturas de 30°C , durante uma hora, ou mantidas a 4°C durante o mesmo período de tempo (dados não apresentados). O péptido OVA-8 foi utilizado a uma concentração final de $75\ \mu\text{M}$ e o péptido OVA-24 a uma concentração de $75\ \mu\text{M}$.

As moléculas K^b incubadas durante a noite a 4°C dissociaram-se quase completamente, como avaliado pela ausência de reactividade com o anticorpo, mas foram quantitativamente recuperadas da mistura de incubação, que continha o péptido OVA-8.

O varrimento densitométrico de colunas de número par (não apresentado) permitiu determinar a quantidade de K^b recuperado após o desafio de temperatura. Os dados forma expressos como percentagens da quantidade de complexos K^b /OVA-8 recuperados após o desafio de temperatura. A maioria das moléculas K^b , que foram incubadas com OVA-8, permaneceu intacta após tratamento a 30°C. O péptido maior, OVA-24, não era tão eficaz como o OVA-8 em estabilizar as moléculas de K^b e, em acordo com os nossos dados anteriores sobre a ligação fraca do OVA-24, apenas cerca de 30% das moléculas K^b permaneceram após o tratamento de temperatura. Quando a mistura de incubação continha o péptido OVA-24 e proteossomas purificados, foi possível imunoprecipitar uma maior quantidade de moléculas K^b e aproximadamente 80% das moléculas K^b sobreviveram à exposição a 30°C. O facto de a maior estabilidade das moléculas K^b ser devida ao(s) péptido(s) derivado(s) de OVA-24 era evidente do facto de os proteossomas sozinhos não conseguirem produzir péptidos no lisado, que pudessem prevenir a dissociação do complexo K^b - β 2M. Esta conclusão é também suportada pelo facto de os proteossomas tratados com o inibidor p-hidroximercuriobenzoato (Rivett, Arch. Bioch. Biophys. 268:1-8(1989)) não conseguirem produzir péptidos de OVA-24, que pudessem estabilizar as moléculas K^b a 30°C.

Estes dados demonstram que os proteossomas isolados podem produzir péptido(s) a partir de um péptido precursor de ligação fraca a K^b , de tal modo que a moléculas de Classe I estabilizadas na mesma extensão que pelos péptidos endógenos. Consequentemente, o péptido(s) derivado(s) de OVA-24 deviam ser de cerca de 8 aminoácidos de comprimento e devem ter incluído a sequência do péptido OVA-8. Além disso, experiências semelhantes em que a ovalbumina desnaturada, reduzida e alquilada foi incubada com proteossomas, também resultaram na recuperação de moléculas K^b termoestáveis (dados não apresentados).

B. Procedimentos

1. Cultura de células

Cresceram-se células HeLa (ATCC No. CCL 185) em meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco, Grand Island, NY), suplementado com soro fetal de vitela a 8%, glutamina 2 mM,

penicilina (100 µg/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). Cresceram-se células de baço de quatro haplótipos de H-2 diferentes (H-2^k, ^s, ^d e ^q), RMA-S, T1, T2 e astrócitos de murídeo, em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY). O RMA-S, uma linha celular mutante de linfoma de H-2^b de murídeo (Ljunggren e Karre, J. Exp. Med. 162:1745-59 (1985); Karre et al., Nature 319:675-8 (1986)), é incapaz de apresentar antigénios endógenos (Townsend et al., Nature 340:443-8 (1989); Townsend e Bodmer, Ann. Ver. Immunol. 7:601-24 (1989)). O T1 e T2 são derivados da linha celular linfoblástico B, mutante, humana, LBL 721.174 (0.174), fundida com o linfoma de células T, CEM (Salter et al., Immunogenetics 21:235-7 (1985)). O T1 o híbrido 0.174-CEM, expressou níveis elevados de MHC de Classe I, derivados de 0.174. O T2, seleccionado para perda de ambas as cópias do cromossoma 6 humano, tem o fenótipo de expressão baixa de Classe I, de 0.174 (Hosken e Bevan, Science 248:367-70 (1990)).

2. Marcação radioactiva metabólica, imunoprecipitação e densitometria

A marcação metabólica das células foi realizada como descrito em Jackson et al. (EMBO J. 9:3153-3162 (1990)), com as seguintes modificações. Salvo indicação em contrário, as células foram tratadas com interferão gama (IFN-gama; Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) (2500 U/ml), durante 96 horas, antes da marcação metabólica. O meio de pulsação continha 0,15 mCi/ml de DMEM deficiente em L[35S]metionina e deficiente em cisteína. As células foram marcadas rotineiramente durante 4 horas, seguido de períodos de "chase" de diferentes durações (até 36 horas), na presença de meio de cultura normal. A imunoprecipitação, SDS-PAGE (Blobel e Dobberstein, J. Cell Biol. 67: 835-51 (1975)) e fluorografia (Bonner e Laskey, Eur. J. Biochem. 46:83-88 (1974)) foram realizadas como descrito (Jackson et al., EMBO J. 9:3153-3162 (1990)). A electroforese gel a uma dimensão, com gradiente de pH de não equilíbrio (utilizando anfolinas de pH 3,5-10) foi realizada como descrito em Jones, in Selected Methods in Cellular Immunology, Mishell e Shigii, eds., Freeman, San Francisco, 1980, pp. 398-400. Para quantificar a radioactividade incorporada nas proteínas, as intensidades das bandas nos fluorogramas foram determinadas por varrimento

densitométrico, utilizando um Ultrosan XL da LKB (Brouma, Suécia). As proteínas marcadoras, radioactivas, albumina de soro bovino (67 kD), ovalbumina (46 kD), anidrase carbónica (30 kD) e lactoglobulina a (18,4 kD) foram adquiridas da New England Nuclear (duPont, Boston, MA).

Para análise de "pulse-chase", os lisados de vários pontos de tempo são divididos em alíquotas em tubos, dependendo do número de anticorpos utilizados para analisar o transporte. O anticorpo é adicionado ao lisado (1 μ l de fluido de ascitos, Y3, 30.5.7, 28:14:8S; W6/32) ou anti-soro (K193, K270), 100 μ l de sobrenadante de cultura de hibridoma (anticorpo B22.293); a mistura é então deixada durante 2-12 horas antes da recolha do anticorpo, por incubação com proteína A-Sepharose, durante uma hora e uma centrifugação de 5 segundos na microcentrífuga.

3. Anti-soros, anticorpo monoclonal e péptidos

Os soros de proteossoma de coelho anti-humano e anti-rato foram gentilmente cedidos pelo Dr. A. Ichihara (Tanaka, *et al.*, J. Cell. Physiol. 139:34-41 (1986)). Os ascitos de Y3, um anticorpo monoclonal contra H2- K^b de ratinho, foram preparados utilizando o hibridoma no. HB 176 da ATCC (Hammerling *et al.*, PNAS USA 79: 4737-4741 (1982)). O IFN-gama de linfócitos-T humanos foi obtido da Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). O IFN-gama de ratinho foi obtido da Genentech (South San Francisco, CA) e da Amgen Biologicals (Thousand Oaks, CA). Os péptidos foram sintetizados por técnicas de fase sólida num sintetizador de péptidos 430A da Applied Biosystems e posteriormente purificados numa coluna de cromatografia de fase inversa, C₁₈ (Vydac).

4. Fraccionamento de homogeneizados de células HeLa com sulfato de amónio

As células HeLa homogeneizadas, não tratadas e tratadas com IFN-gama, foram centrifugadas para remover restos nucleares e celulares e os sobrenadantes resultantes foram submetidos a fraccionamento com sulfato de amónio, como descrito (Rivett, J. Biol. Chem. 260:12600-12612 (1985)). Os complexos de proteossoma 26S presentes no sobrenadante, foram selectivamente precipitados com sulfato de amónio a uma

saturação de 38%, enquanto que os complexos de proteossoma 19S presentes no sobrenadante após o passo de fraccionamento a 38%, foram precipitados em sulfato de amónio a 60% (Waxman *et al.*, J. Biol. Chem. 262:2451-57 (1987)).

5. Fraccionamento de microssomas e citosol

As células HeLa não tratadas e tratadas com IFN-gama foram marcadas durante 4 horas, homogeneizadas e submetidas a centrifugação diferencial. Os homogeneizados foram primeiro centrifugados a 15000 rpm durante 30 minutos, para remover os restos nucleares e celulares. Os sobrenadantes resultantes foram então centrifugados a 100000Xg durante 30 minutos, para sedimentar os microssomas. Os proteossomas nas fracções de sobrenadantes (fracção citosólica) e nas peletes (fracção microssómica bruta), foram separadamente imunoprecipitados e analisados por electroforese em gel, a duas dimensões.

6. Purificação de proteossomas

Os proteossomas foram purificados a partir de fígado de bovino fresco, utilizando uma modificação do processo descrito por Skilton *et al.* (1991). Em resumo, o fígado de bovino fresco foi homogeneizado em Tris-HCl 10 mM (pH 7,2), KCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM e glicerol a 20% (v/v) ("tampão A"). O homogeneizado foi centrifugado a 105000Xg durante uma hora. O sobrenadante foi primeiro tratado com sulfato de amónio a uma saturação de 38%, de modo a remover agregados de proteínas grandes, bem como a forma 26S do proteossoma (Waxman *et al.*, J. Biol. Chem. 262:2451-57 (1987)). O sobrenadante remanescente foi então tratado com sulfato de amónio a uma saturação de 60%, de modo a precipitar selectivamente a forma 19S do proteossoma. A pelete foi ressuspensa num pequeno volume de tampão A. A fracção de sulfato de amónio a 60% ressuspensa, foi submetida a três passos de cromatografia, sequenciais: DEAE-Sepharose, cromatografia de troca aniónica em Mono Q 10/10 e por fim filtração em gel numa coluna de Superose 6. Após cada passo cromatográfico, as fracções contendo proteossomas foram identificadas por SDS-PAGE e por análise da actividade de peptidase, como descrito em Hough *et al.*, J. Biol. Chem. 262: 8303-8313 (1987). Os substractos de péptidos utilizados foram:

N-succinil-ala-ala-phe-MCA, N-succinil-leu-leu-val-tyr-MCA e t-butoxicarbonil-phe-ser-arg-MCA.

7. Teste de ligação do péptido

Preparou-se um lisado de células RMA-S contendo moléculas K^b de Classe I "vazias", utilizando um processo modificado (Ljunggren *et al.*, Nature 346:476-80 (1990)). Em resumo, as células RMA-S foram cultivadas em RPMI 1640 a 26°C, durante 8 horas. As células foram então lavadas uma vez com PBS e mais uma vez incubadas a 26°C em meio contendo 0,25 mCi/ml de L-[³⁵S]metionina e 0,25 mCi/ml de L-[³⁵S]cisteína, em RPMI 1640 deficiente em metionina e deficiente em cisteína e em meio RPMI 1640 normal, a uma razão de 10:1, durante 16 horas. As células foram lavadas em PBS e lisadas, como descrito acima. O lisado contendo moléculas K^b de Classe I "vazias", foi então incubado com péptidos e/ou proteossomas purificados, a 26°C durante 1 hora, antes de ser submetido a incubação a 30°C, por mais uma hora. Esta mistura foi então submetida a imunoprecipitação com o anticorpo monoclonal Y3 e analisada por SDS-PAGE.

Exemplo 3

Indução de efectores citotóxicos *in vitro*

A. Carregamento osmótico

O carregamento osmótico de células SC2 e 3T3 com a proteína ovalbumina foi realizado como descrito por Moore *et al.*, Cell 54:777-785 (1988). O procedimento teste é como se segue. Numa placa de 96 poços, fez-se a co-cultura de 1×10^5 células de *Drosophila* (com ou sem péptido/proteína carregado) ou células 3T3, com 1×10^5 células do hibridoma de células T B3/CD8, em 200 μ l de meio RPMI suplementado com soro fetal de bovino a 10%. Após 24 horas de incubação, adicionaram-se 100 μ l do sobrenadante destas culturas a 100 μ l de RPMI contendo 5000 células CTLL. As células forma co-cultivadas durante 24 horas a 37°C, adicionando-se nessa altura 1 μ Ci de ³H-timidina (Amersham). Após uma nova incubação durante 15 horas, a 37°C, a incorporação do marcador radioactivo nas células CTLL foi determinada por contagem de cintilação.

Pelos testes realizados com MHC de murídeo, também se verificou que as células de insecto são capazes de carregar péptidos nas moléculas de Classe I. As células que expressam tão pouco quanto 200-500 moléculas de MHC contendo um antigénio particular, podem ser detectadas por uma célula T. Dado que as células de *Drosophila* não acumulam crómio, utilizou-se um teste de apresentação de antigénios baseado em B3/CD8, um hibridoma de células T. O B3/CD8 é um hibridoma entre B3, célula T citotóxica específica para o péptido de ovalbumina 253-276 apresentado pelas moléculas de Classe I, H-2K^b e a linha celular que segrega IL-2, contendo CD8 (veja-se Carbone *et al.*, supra, 1989). Por estimulação antigénica, o B3/CD8 produz IL-2, medido por incorporação de ³H-timidina na linha celular dependente de IL-2, CTLL (Gillis *et al.*, J. Immunol. 120:2027 91978)). Assim, medindo a quantidade de IL-2 produzida, pode-se testar o reconhecimento de células T.

De modo a se obter um conjunto intracelular da proteína ovalbumina a partir da qual os péptidos OVA podem ser derivados, a ovalbumina (Sigma Chem. Co, MO) foi osmoticamente carregada nas células, como descrito por Moore *et al.*, supra (1988). Imediatamente após o carregamento, as células foram misturadas com o hibridoma de células T. Após dois dias de incubação, o meio foi removido e testado quanto a IL-2. A quantidade de IL-2 foi determinada pela capacidade do meio suportar o crescimento da linha celular dependente de IL-2, CTLL (Gillis *et al.*, supra, 1978) e o crescimento foi quantificado pela quantidade de timidina radioactiva incorporada nas células. Pode ver-se, pela Fig. 4, que as células T responderam bem às células de *Drosophila* quando o péptido de ovalbumina foi adicionado ao meio de cultura, mas não ocorreu nenhum reconhecimento quando as células foram carregadas com a proteína ovalbumina. As moléculas de MHC de Classe I expressas na superfície celular da célula de insecto, são totalmente funcionais, na medida em que podem ligar o péptido, quando este é adicionado ao meio de cultura, e podem apresentá-lo no contexto correcto, para que este seja reconhecido por uma célula T.

B. Optimização de condições *in vitro*

Para a optimização de condições *in vitro*, para a produção de células T citotóxicas, específicas, a cultura de células

estimuladoras de células de *Drosophila* é de preferência mantida em meio isento de soro (e.g. Excell 400). As células estimuladoras de células de *Drosophila* são preferencialmente incubadas com >20 µg/ml de péptido. A razão efector:estimulador (razão linfócito:célula de *Drosophila*) é de preferência na gama de cerca de 30:1 a 300:1. CD8 específicas, máximas, observam-se geralmente após cinco dias de cultura. A cultura de células alvo para testar a morte é preferencialmente mantida num meio isento de soro.

C. Teste citotóxico de libertação de ⁵¹Cr

A actividade citolítica mediada por células foi detectada com um teste de ⁵¹Cr ou libertação. A percentagem de lise específica de 10⁴ células alvo marcadas com ⁵¹Cr, em 200 µl, foi determinada para vários linfócitos, para se obterem razões e curvas de dose-resposta para cada população de linfócitos, representando graficamente a citotoxicidade versus o log 10 do número de efectores viáveis. Os valores de libertação espontânea de ⁵¹Cr variaram entre 5% e 15% do marcador total incorporado. A percentagem de libertação específica de ⁵¹Cr foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: (ER-MR)(MR-SR) x100, em que ER é a libertação experimental de ⁵¹Cr, observada, SR é a libertação espontânea detectada por incubação das células alvo apenas no meio de cultura e MR é o máximo de radioactividade libertada das células alvo, após incubação em 200 µl em HCl, no tempo de duração do ensaio.

D. Indução de efectores citotóxicos por estimulação primária *in vitro*, com células de *Drosophila* que expressam Classe I de murídeo e péptidos

Utilizaram-se os péptidos OVA, NP (influenza) e NP (LcMV) como uma fonte de péptidos, para determinar a sua capacidade de produzir uma resposta primária de CD8 *in vitro* (Veja-se Figs. 6A e B). Uma incubação de cinco dias de células de baço de ratinhos C57BL/6 e Balb/c imunizados, com as respectivas células de *Drosophila* que expressam H2-K^b + antigénio e H2-L^d + antigénio, produziu efectores que lisaram eficazmente o tumor EL4 e P815 na presença de péptidos.

O P815 (ATCC T1B 64) (H-2^d) é um mastocitoma de ratinhos DBA/2. O EL4 (ATCC T1B 39) é um timoma de C57BL/6 (H-2^b). O

EL4 é transfectado com ADNc de OVA, numa construção de plasmídeo com o promotor de β -actina humana, para derivar a linha celular de produção de OVA, EL4-OVA. Estes tumores são mantidos como uma cultura em suspensão, estacionária, em RPMI 1640, suplementado com soro fetal de bovino, FBS, a 10% (veja-se Moore *et al.*, Cell 54:777-785 (1988)). O Jurkart (ATCC CRL 8163) é uma linha celular humana que expressa HLA B7. O Jurkart A2 é uma linha celular transfectada, produzida por transfecção de células Jurkart com HLA A2-1, e.g. através de métodos aqui descritos (veja-se também Irwin *et al.*, J. Exp. Med. 170:1091-1101 (1989)).

Os péptidos sintéticos podem substituir proteínas virais sintetizadas endogenamente, durante o reconhecimento de CD8. As CD8 específicas produzidas, conseguiram reconhecer péptidos sintetizados endogenamente, apresentados pela Classe I na superfície de EL4 (transfectados com um ADNc de ovalbumina) (Veja-se Moore *et al.*, Cell 54:777-785 (1988)). De modo semelhante, as CD8 produzidas *in vitro* contra D^b carregados com o péptido NP de influenza, reconheceram as células alvo EL4 infectadas com a estirpe A/PR/8 do vírus de influenza (veja-se Fig. 7) (Veja-se Carbone *et al.*, J. Exp. Med. 167:1767-1779 (1988)); a estirpe A/PR/8/34 também está disponível da American Type Culture Collection com o número de concessão ATCC VR-95).

E. Caracterização de células citotóxicas anti-péptido

Para determinar se o reconhecimento específico de péptidos era, de facto, devido à actividade de células T, estas linhas foram tratadas com anti-CD8 (OKT8, ATCC No. CRL 8014) ou anti-CD4 (OKT4, ATCC No. CRL 8002) e/ou complemento, antes da sua adição à cultura teste. Apenas o tratamento anti-CD8 eliminou a citotoxicidade.

Estas CD8 específicas foram testadas em células 3T3/D^b e 3T3/K^b, produzidas por transfecção de células BALB 3T3 (ATCC CCL 163), quer com D^b, quer K^b, respectivamente. (Estão também disponíveis para uso, outras culturas de 3T3 que podem ser facilmente adquiridas, incluindo ATCC CCL 163.2). De preferência, os transfectantes estáveis são preparados por co-transfecção de 3T3 por p^{CMU}/K^b ou p^{CMU}/D^b e pSV2neo e são seleccionados com G418 (Veja-se também Joly e Oldstone, *supra*

(1991). A resposta de CD8 anti-OVA era restrita a D^b ou K^b, confirmando que estas actividades apresentam uma restrição a MHC de Classe I, clássica.

A capacidade de desencadear CD8 pela estimulação de péptidos possibilita uma técnica relativamente simples, com a qual se pode estudar o reconhecimento restrito a Classe I. Uma vez que as células T são específicas para as formas desnaturadas e não para as naturais ou antigénios estranhos, os péptidos representam claramente um meio potencial de vacinação, eficaz.

F. Produção de células CD8 específicas

Os complexos de Classe I de péptidos de células de *Drosophila* foram fixados com gluteraldeído a 0,001% e foram em seguida lavados e utilizados como estimuladores na co-cultura de linfócitos. Detectou-se uma actividade citotóxica muito fraca após 5 dias de co-cultura, confirmando que as células de *Drosophila* vivas (i.e. não fixadas) são superiores em produzir CD8 específicas. A adição de sobrenadante da cultura de *Drosophila* a 10%, às células fixadas, restaura a produção de CD8 específicas (veja-se figs. 8A e B).

As células cultivadas que expressam os antigénios de Classe I isogénicos, que normalmente não conseguem activar as CD8 em cultura primária, foram capazes de produzir CD8 específicas, após a adição do sobrenadante da cultura de células de *Drosophila*.

A remoção de células CD4+ e de Classe II+ da população que responde, diminui a actividade de CD8 gerada pelo péptido carregado nas células de *Drosophila*. Assim, as respostas primárias induzidas pelas células de *Drosophila* carregadas com péptido, parece ser dependente de células CD4+ e de Classe II.

Exemplo 4

Eficácia do tratamento *in vivo*

A. Rejeição de tumores

Utilizando os métodos aqui descritos, é agora possível matar especificamente células alvo em seres humanos,

utilizando as células CD8 activadas, específicas, pelos métodos da presente invenção. Essencialmente, a metodologia de tratamento inclui os seguintes passos: (1) obter uma amostra de fluido contendo células T, de um indivíduo a tratar; (2) carregar moléculas de MHC de Classe I vazias, com pelo menos uma espécie de péptido antigénico, em que o péptido é substancialmente homólogo a pelo menos uma porção de um péptido derivado a partir da célula alvo; (3) misturar as células T *in vitro* com uma quantidade de moléculas de MHC de Classe I carregadas com péptido, suficiente para produzir células CD8 activadas; (4) recolher as células CD8 activadas da cultura; e (5) administrar as células CD8 activadas ao indivíduo a tratar.

Esta metodologia já está a apresentar resultados promissores num modelo de ratinho. Por exemplo, num estudo, injectaram-se subcutaneamente ratinhos C57BL/6 fêmea (de cerca de 6-8 semanas de idade) com três milhões (3MM) de células de tumor EL4/OVA, mesmo atrás das orelhas. As células de tumor foram tornadas tumorigénicas por uma única passagem em ratinhos C57BL/6. No dia da inoculação subcutânea com células de tumor EL4/OVA, os ratinhos foram injectados com células CD8 estimuladas com *Drosophila*/K^b/OVA, quer próximo (proximal a) do local do tumor, quer intravenosamente.

No dia 8, mediram-se as dimensões do tumor. Os cinco ratinhos controlo que receberam apenas 3MM de células de tumor, tinham tumores que mediam 12 mm x 12 mm. Analisaram-se três ratinhos que receberam células de tumor e 24MM de células CD8 injectadas IV; os tamanhos dos tumores eram (a) 2 mm x 2 mm, (b) 5 mm x 5 mm e (c) 12 mm x 12 mm, nesses ratinhos. Analisaram-se cinco ratinhos que receberam células de tumor e 24MM de células CD8 próximo do local de injeção do tumor. Os resultados foram como se segue: (i) três ratinhos não tinham tumores detectáveis no dia 8; (ii) um ratinho tinha um tumor que media 1mm x 1mm; e (iii) um ratinho tinha um tumor que media 5 mm x 5 mm.

No dia 11, determinaram-se os tamanhos dos tumores como sendo os seguintes:

Grupo	# ratinhos	Tamanho do tumor
Controlo	3	15 mm x 12 mm
"	2	20 mm x 12 mm
3MM Tumor + 24MM CD8 IV	1	5 mm x 5 mm
"	1	10 mm x 5 mm
"	1	13 mm x 8 mm
3MM Tumor + 24MM CD8 IP	2	NENHUM TUMOR
"	1	0,5 mm x 1,0 mm
"	1	1 mm x 1 mm
"	1	1,5 mm x 1,5 mm

Numa experiência subsequente, mediu-se o volume de tumores em ratinhos, após a aplicação de vários regimes. Os ratinhos foram injectados com três milhões (3MM) de células de tumor EL4/OVA, como descrito acima. No dia da inoculação subcutânea com células de tumor EL4/OVA, os ratinhos foram pré-injectados com células CD8 estimuladas com *Drosophila/K^b/OVA*, quer intraperitonealmente, subcutaneamente ou intravenosamente, como descrito na tabela 2 a seguir. O volume do tumor foi medido nos dias 6, 8, 10, 12 e 20 após a injeção. Incluíram-se cinco ratinhos em cada grupo experimental e de controlo. Os resultados são apresentados na tabela 2 a seguir.

Tabela 2

Ratinho	#CD8/método	VOLUME DO TUMOR MEDIDO, DIA				
		6	8	10	12	20
1	30MM, IP	0	0	0	0	0
2	"	0	0	0	0	0
3	"	0	0	0	0	0
4	"	0	0	0	0	0
5	"	0	1	2	1	0
1	30MM, IV	0	0	0	0	0
2	"	0	0	0	0	0
3	"	0	0	0	0	0
4	"	0	2	3	2	0
5	"	2	3,5	5	3	0
1	15MM, IV	0	0	0	0	0

Ratinho	#CD8/método	VOLUME DO TUMOR MEDIDO, DIA				
		6	8	10	12	20
2	"	0	0	0	0	0
3	"	5	8	13	20	+*
4	"	5	10	20	25	+
5	"	6	14	25	35	+
1	30MM, SC	0	0	0	0	0
2	"	0	0	0	0	0
3	"	0	0	0	0	0
4	"	2	4	5	2	0
5	"	2	7	10	3	0
1	K ^b /OVA sozinho	0	0	0	0	0
2	"	0	0	0	0	0
3	"	0	6	12	5	10
4	"	3	8	18	10	20
5	"	2	10	20	20	30
1	Controlo	3	10	20	>50	+
2	"	4	18	30	>50	+
3	"	6	18	30	>50	+
4	"	7	24	35	>50	+
5	"	7	24	40	>50	+

IP = intraperitoneal; IV = intravenoso; SC = subcutâneo; * = medição difícil devido ao tamanho, ou morte do animal

B. Tratamento de influenza

Podem-se produzir populações de CD8 específicas para influenza, por exemplo, de acordo com as técnicas aqui descritas e estas mostrarem ser eficazes na protecção de indivíduos contra infecção por influenza, letal. As CD8 reactivas a vírus, derivadas da estimulação de péptidos *in vitro*, são capazes de proporcionar protecção *in vivo* e sugerem que a estimulação primária de CD8 *in vitro* pode provar ser útil na concepção de uma grande variedade de vacinas antivirais e anti-retrovirais.

C. Estimulação *in vivo* de ratinhos, com células de *Drosophila* transfectadas com Classe I

A injeção de 50×10^6 células de *Drosophila* intraperitonealmente (IP) levou à indução de CD8 específicas. A detecção desta estimulação foi realizada utilizando uma

análise de diluição limitante. A frequência de CD8 específicas para OVA era de cerca de 10^6 em ratinhos não previamente estimulados ("naive"). Após injeção de células de *Drosophila* revestidas com péptido, a frequência era de cerca de 10^3 (dados não apresentados).

A figura 8 (A e B) mostra a estimulação *in vivo* com células de *Drosophila* transfectadas, em que os que respondem são células de baço de ratinho C57BL/6. Em 8A, algumas das células são fixadas; em 8B, as células de *Drosophila* são todas não fixadas.

Para uma resposta de CD8 secundária, os ratinhos C57BL/6 foram estimulados por uma injeção de células de *Drosophila* IP (5×10^7) e testados 5-15 dias após a imunização (Veja-se Figura 8B). A indução de CD8 activadas estimula aparentemente a rejeição de tumores.

Noutra experiência, os ratinhos C57BL/6 foram injectados subcutaneamente com 3MM de EL4 OVA. Cinco dias mais tarde, os ratinhos do grupo I receberam uma injeção subcutânea de 50 MM de células de *Drosophila* (vivas) que expressam K^b/OVA ; os ratinhos do grupo II receberam uma injeção subcutânea de 50MM de células de *Drosophila* fixadas com K^b/OVA ; os ratinhos do grupo III eram o grupo controlo e não receberam nenhuma injeção adicional no dia 5. Os resultados da experiência estão ilustrados na Figura 9, que mostra que o grupo I de ratinhos sobreviveu mais tempo e em maior número.

As CD8 primárias foram induzidas por Classe I carregadas com péptidos em células de *Drosophila*, em ratinhos B6 não estimulados. As células CD8 foram estimuladas uma vez *in vitro*, com células de *Drosophila* cultivadas durante 36 horas a 22°C , incubadas com diferentes concentrações de péptidos OVA. A quantidade mínima final de péptido é de cerca de $20 \mu\text{g/ml}$. Os efectores foram recolhidos e testados em células RMA-S com $50 \mu\text{g}$ de péptidos. As populações de células CD8 eram capazes de reconhecer RMA-S OV-8 (Veja-se Figs. 6A e B).

Noutra experiência, a proteína ovalbumina foi degradada com endoproteínase Glu-C (de *Staph. aureus*; Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). A mistura foi adicionada a uma

cultura de células de *Drosophila* com MHC de murídeo. Após cerca de 5 dias, as células CD8 foram expostas aos efectores; um número de células CD8 foram capazes de reconhecer o RMA-S OVA-8.

D. Titulação do péptido ao nível da célula alvo

Estudos recentes demonstraram que os péptidos de 9 aminoácidos de comprimento estão presentes como uma espécie menor, em preparações de péptidos sintéticos. Os que têm mais de 9 aminoácidos ligam-se com baixa afinidade à molécula de MHC de Classe I, H-2K^b. Experiências de titulação de péptidos mostraram que uma concentração 50 vezes inferior, de um péptido 9-mero, em relação a um péptido 16-mero, é suficiente para a indução da resposta de células T. Realizou-se a mesma titulação de péptidos para a sensibilização da célula alvo. Os resultados indicam que a sensibilização da célula alvo é realizada com uma concentração cerca de 1000 vezes menor do que a necessária para a indução de resposta *in vitro*.

E. Produção de CD8 em ratinhos transgênicos

Neste estudo, utilizaram-se ratinhos transgênicos que expressam HLA A2.1, HLA B7 e HLA B27. As células de baço dos ratinhos foram cultivadas com células de *Drosophila* que expressam o HLA isogênico (A2.1, B7 e B27, respectivamente). As respostas específicas de CD8 foram produzidas contra três péptidos de HIV (veja-se Figs. 10A, B e C).

Utilizam-se ratinhos melhorados geneticamente C57BL/6y (H2^b) e Balb/c (H2^d) nestes estudos, bem como vários ratinhos transgênicos. Os ratinhos transgênicos incluem os seguintes. Os ratinhos transgênicos B7 são produzidos em laboratório, como se segue. Em resumo, um clone de HLA-B7 genómico (incluindo várias centenas de pares de bases de regiões flanqueadoras 5' e 3') são micro-injectados em embriões de rato B6 x SJL (Scripps Research Institute Transgenic Facility, La Jolla, CA). A linha transgênica B7 foi cruzada de novo com C57BL/6 (H2^b) (Scripps Research Institute Transgenic Facility, La Jolla, CA). Os ratinhos transgênicos B27 podem ser produzidos de acordo com métodos conhecidos; os nossos foram produzidos injectando clones genómicos em embriões de B6XSJL e

cruzando os mesmos de novo com C57BL/6 (Scripps Research Institute Transgenic Facility, La Jolla, CA) (Veja-se também Krimpenfort *et al.*, EMBO J. 6(68):1673 (1987), para outro método de produzir ratinhos transgênicos B27). Os ratinhos transgênicos de microglobulina $\beta 2$ e ratinhos transgênicos A2-1 são produzidos de modo semelhante, utilizando técnicas conhecidas (veja-se, e.g. Irwin *et al.*, J. Exp. Med. 170:1091-1101 (1989)).

F. Produção de CD8 específicas para HIV, em humanos

Testaram-se os PBL de dadores seronegativos quanto à sua capacidade de produzir CD8 específicas contra dois péptidos de HIV. Estes dadores são HLA A2, HLA B7 ou HLA B27. Após 5 dias de cultura, foi possível detectar uma actividade de CD8 muito forte, na cultura, contra ambos os péptidos de HIV (veja-se Figs 11 A, B e C).

Os PBL humanos são isolados por centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Piscataway, NJ). Os linfoblastos PBL são armazenados em azoto líquido, após congelação em FBS contendo DMSO a 10%. A viabilidade celular e funções dos linfócitos são conservadas.

As células CD8 específicas de péptidos são produzidas em cultura primária isogénica, com células de *Drosophila* que expressam o complexo de Classe I do péptido isogénico. Estas culturas são estabilizadas com 3×10^7 células de baço de ratinho ou PBL humano, que respondem, e 10^6 células de *Drosophila* vivas, em 20 ml de meio de cultura RPMI 1640, suplementado com β -mercaptoetanol 5×10^{-5} M, FBS a 0,5%, num frasco vertical de 25 cm², a 37°C em CO₂ a 7%. As células CD8 são recolhidas após 5 dias de cultura.

Noutra experiência, os PBL humanos foram recolhidos e estimulados num período de 5 dias, com células de *Drosophila* que expressam o HLA A2.1 humano e carregadas com o péptido POL de HIV. Os PBL estimulados foram então testados em células Jurkart A2.1 infectadas com HIV. Os resultados da experiência são ilustrados na figura 12. Os PBL humanos estimulados *in vitro* foram claramente capazes de reconhecer o A2.1 POL em células infectadas e de matar as referidas células.

Exemplo 6

Aplicações terapêuticasA. Banco de moléculas de Classe I

Pode-se estabelecer e manter um reservatório ou "banco" de linhas celulares de *Drosophila*, em que cada linha celular expressa uma das 50 a 100 moléculas de Classe I mais comuns. Os ADNc que codificam para estas proteínas podem ser clonados com base nas variantes de HLA, obtidas a partir de linhas celulares contendo as mesmas - e.g. através de reacção em cadeia com polimerase (veja-se Ennis *et al.*, PNAS USA 87:2833-7 (1990)) - e inseridas no vector adequado, tal como um vector de expressão de insecto, para produzir linhas celulares que expressam cada variante de HLA. Pode-se fazer um teste de acordo com o seguinte protocolo, por exemplo, para determinar quais os péptidos derivados do vírus de escolha, que se ligam às diferentes moléculas de Classe I. As várias culturas podem ser adequadamente marcadas ou catalogadas, para indicar que moléculas de Classe I são melhores para utilizar com péptidos particulares. Alternativamente, podem-se estabelecer culturas de células transientes, como necessário. Tal como aqui discutido, após aproximadamente 48 horas de incubação de uma cultura de células de insecto com um vector, a cultura é aparentemente capaz de expressar moléculas de MHC vazias, que podem ser carregadas com o(s) péptido(s) de escolha, com o fim de activar células CD8.

B. Preparação de linhas celulares "especiais"

Após tipagem de HLA, se as células de *Drosophila* que expressam o HLA preferido não estão disponíveis, os ADNc que codificam para o HLA preferido podem ser clonados, através da utilização da reacção em cadeia com polimerase. Os iniciadores descritos na secção B.1. acima (SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 12) podem ser utilizados para amplificar os ADNc de HLA-A, -B, -C, -E, -F ou -G adequados, em reacções separadas, que podem então ser clonados e sequenciados, como referido nos métodos descritos no Exemplo 1, secção 1, acima. O ADN é então purificado a partir da reacção de PCR, utilizando um kit Gene Clean (Bio 101, San Diego, CA) e ligado directamente no local de Sma I de pRMHa-3. Os clones individuais são isolados, as

sequências verificadas e as linhas celulares de *Drosophila* que expressam o HLA são estabelecidas. Alternativamente, pode-se crescer uma população de plasmídeos recombinantes em grande escala, e o ADN pode ser purificado por gradientes de cloreto de céσιο. O ADN purificado é então utilizado para transfectar células Schneider, utilizando técnicas de precipitação com fosfato de cálcio. Após 24 horas, o precipitado é removido das células por lavagem e substituído com meio Schneider fresco, contendo CuSO_4 1 mM. Quarenta e oito horas mais tarde, a população de células transfectadas de forma transiente é utilizada para a activação *in vitro* de CD8, após incubação com péptidos isogénicos ou fragmentos de proteínas específicas digeridas com proteases.

Podem-se então estabelecer linhas celulares estáveis que expressam o HLA clonado, em células de *Drosophila*. Alternativamente, uma população de células de insecto que expressa de forma transiente uma população de moléculas recombinantes, clonadas a partir de uma reacção e PCR, pode ser utilizada para activação de CD8 *in vitro*.

É também possível activar CD8 específicas do haplótipo, *in vitro*, utilizando células de insecto que expressam MHC de Classe I incubadas com péptidos, em que o MHC expresso pela linha celular não é o elemento expresso *in vivo*. Isto proporciona uma oportunidade única para proliferar células CD8 que reconhecem um antigénio específico associado com um MHC particular, o que não seria possível *in vivo* devido à restrição alélica. Por exemplo, um péptido (NP) da proteína nuclear do vírus de influenza é normalmente restrito à molécula D^b ; no entanto, verificámos que este péptido se pode ligar a K^b (apesar de mais fracamente do que a D^b) e pode conferir um grau de estabilidade térmica ao K^b (veja-se fig.3). Além disso, as células de *Drosophila* que expressam K^b , pré-incubadas com o péptido NP e co-cultivadas com células de baço de um ratinho B6, resultam na activação *in vivo* de CD8 que reconhecem especificamente a molécula K^b associada com o péptido NP. Adicionalmente, a experiência recíproca utilizando um péptido (OVA) restrito a K^b , derivado de ovalbumina e células de *Drosophila* que expressam D^b , resultou na proliferação de CD8 que reconhecem especificamente D^b contendo o péptido OVA. Estas CD8 são capazes de matar células (EL4

OVA) transfectadas com ADNc que codifica para a proteína ovalbumina, indicando que *in vivo*, algumas moléculas de D^b estão carregadas com o péptido OVA.

Este sistema proporciona assim uma oportunidade única para proliferar CD8 contra antigénios apresentados por uma molécula de Classe I que, *in vivo*, não é o elemento de restritivo para esse péptido. Embora esteja apresentado antigénio suficiente *in vivo*, pela referida Classe I, para que a célula seja reconhecida por CD8 e morta, este não é suficiente para proliferar estas CD8 *in vivo*. Carregando moléculas de Classe I vazias, expressas por células de *Drosophila*, com um péptido, somos presumivelmente capazes de ultrapassar a restrição *in vivo*, proporcionando um excesso de péptido antigénico à molécula de Classe I, num ambiente não competitivo, de modo a que seja apresentado antigénio suficiente pela Classe I, para activar as CD8 específicas que reconhecem este complexo.

C. Tratamento da SIDA

As células activadas *in vitro* podem ser administradas a pacientes, para terapia *in vivo*. De preferência, o genótipo de Classe I (haplótipo) do indivíduo é primeiro determinado. A tipagem de tecido convencional é adequada para este fim e pode ser realizada no centro de tratamento, ou através de alguma operação comercial adequada. Uma vez determinado(s) o(s) tipo(s) de HLA do indivíduo, determina-se a melhor combinação de péptidos e moléculas de Classe I, adequadas para o paciente individual, e esta é preparada como referido acima e as células de *Drosophila* e péptidos adequados são proporcionados para o tratamento do paciente. As células CD8(T) em repouso ou precursoras, do sangue do paciente são então estimuladas com o MHC carregado com péptido adequado, produzido pela cultura de células de *Drosophila*. Após activação, as células CD8 são reintroduzidas na corrente sanguínea do paciente e o processo da doença no paciente continua a ser monitorizado. Os métodos para remover e reintroduzir componentes celulares são conhecidos na arte e incluem processos como os exemplificados na patente U.S. No. 4844893 de Honsik *et al.* e patente U.S. No. 4690915 de Rosenberg.

Podem-se administrar tratamentos adicionais, como necessário, até a doença estar suficientemente remediada. Protocolos de tratamento semelhantes são adequados para utilização com outros indivíduos imunossuprimidos, incluindo pacientes de transplantes, pacientes idosos e semelhantes.

D. Tratamento do cancro

Em pacientes com cancro, utiliza-se um processo de tratamento semelhante ao descrito acima. No entanto, nestes pacientes, deve antecipar-se que uma terapia convencional para reduzir a massa de tumor pode preceder a terapia imunitária aqui descrita. Assim, é preferido obter e armazenar (e.g. por congelação) amostras de sangue do paciente putativo, antes de iniciar a terapia convencional, tal como radiação ou quimioterapia, que tende a destruir células imunitárias. Dado que poucas, se algumas, formas de cancro surgem em resposta directa a uma infecção viral, os péptidos alvo para o tratamento imunitário são menos facilmente observados. No entanto, estudos recentes indicam que mutações nos oncogenes *ras*, *neu* e *p53* contribuem para o cancro em tanto quanto 50% de todos os casos de cancro. Assim, os péptidos derivados destas regiões mutadas das moléculas, são candidatos excelentes como alvos para a presente terapia. De acordo com os protocolos aqui descritos, pode-se determinar e administrar a melhor combinação de péptidos e moléculas de Classe I para o paciente individual.

Por exemplo, muitos tumores expressam antigénios que são reconhecidos *in vitro* pelas células CD8 derivadas do indivíduo afectado. Estes antigénios, que não são expressos em células normais, podem assim ser identificados, bem como o tipo de HLA que os apresenta às células CD8, para uma imunoterapia direccionada com precisão, utilizando os métodos da presente invenção. Por exemplo, van der Bruggen *et al.*, descreveram um antigénio cuja expressão é direccionada por um gene específico e cujo antigénio parece ser apresentado por HLA A1 (Science 254:1643-1647 (1991)). À medida que vários antigénios de tumor humano são isolados e descritos, tornam-se bons candidatos para aplicações imunoterapêuticas como as aqui descritas.

E. Terapias combinadas/conjugados

Poderá também ser possível administrar as células CD8 activadas *in vitro* através de métodos da presente invenção, em conjugação com outros imunogénios. Por exemplo, o imunogénio multivalente grande descrito na patente U.S. N°. 5045320 pode ser administrado em conjugação com células CD8 activadas.

Também é contemplado que citóquinas como IL2 e IL4, que medeiam a diferenciação e activação de células T, possam ser igualmente administradas, dado que as citóquinas são capazes de estimular a resposta de células T contra células de tumor *in vivo*. Pensa-se que a IL-2 desempenha um papel principal no crescimento e diferenciação de precursores de CTL (CD8) e na proliferação de CD8. A administração de IL2 a pacientes com cancro é frequentemente associada com uma melhor resposta antitumoral, o que está provavelmente relacionado com a indução de células T específicas de tumor. No entanto, os melhores efeitos terapêuticos da IL2 podem ser obtidos por administração local contínua, em vez de sistémica, de IL2, minimizando assim a toxicidade de IL2 e prolongando a sua actividade biológica. Assim, sugere-se aqui que se pode obter um fornecimento local através da transfecção de células de tumor com uma construção do gene de IL2.

O ADNc de IL2 é construído como descrito por Karasuyama e Melchers em Eur. J. Immunol. 18:97-104 (1988). A sequência de ADNc completa de IL2 é obtida como um fragmento Xho I, a partir de IL2 do plasmídeo pBMGneo (veja-se Karasuyama e Melchers, *supra*) e ligada directamente no local Sal I em pRmHa-3. O plasmídeo recombinante pRmHa-3 com a inserção na orientação correcta (determinada através de mapeamento com enzimas de restrição com Hind III) é purificado por gradientes de céσιο e utilizado para co-transfectar células Schneider 2, utilizando a técnica do fosfato de cálcio. (Preparou-se uma mistura de ADN de plasmídeo para este fim: 10 µg de pRmHa-3 contendo ADNc de IL2, 6 µg cada de plasmídeo pRmHa-3 contendo a cadeia pesada de MHC de classe 1 ou microglobulina β2 e 2 µg de ADN de phshsneo). Obtiveram-se linhas celulares estáveis que são indutíveis através de CuSO₄ para expressar a cadeia pesada, microglobulina β2 e IL2, crescendo os transfectantes em meio G418. Estas linhas celulares estáveis foram revestidas

com péptido e utilizadas no teste *in vitro*, como descrito acima. Observa-se que as células de tumor transfectadas com IL2 aumentam a actividade de CTL (CD8) contra as células de tumor progenitoras e contornam a função de CD4 e T ajudante, na indução de uma resposta antitumoral ou citotóxica, *in vivo*. Assim, sugere-se aqui aumentar o potencial do sistema de *Drosophila* através da co-transfecção com o gene de IL2.

O anteriormente descrito pretende ser ilustrativo da presente invenção, mas não limitativo. Podem fazer-se várias variações e modificações, dentro do âmbito das reivindicações.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

- (i) REQUERENTE: Per A Peterson
Michael Jackson
Pierre Lenglade-Demoyen
- (ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: ACTIVAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS T
CITOTÓXICAS
- (iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 36
- (iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:
 - (A) DESTINATÁRIO: The Scripps Research Institute
 - (B) RUA: 10666 North Torrey Pines Road, TPC 8
 - (C) CIDADE: La Jolla
 - (D) ESTADO: California
 - (E) PAÍS: EUA
 - (F) ZIP: 92037
- (v) FORMATO LEGÍVEL EM COMPUTADOR:
 - (A) TIPO DE MEIO: Disquete
 - (B) COMPUTADOR: PC compatível com IBM
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versão #1.25
- (vi) DADOS DO PRESENTE PEDIDO:
 - (A) NÚMERO DO PEDIDO: PCT/US93/
 - (B) DATA DE APRESENTAÇÃO: 18-FEB-1993
 - (C) CLASSIFICAÇÃO:
- (vii) DADOS DE PEDIDO ANTERIOR:
 - (A) NÚMERO DO PEDIDO: 07/841,662
 - (B) DATA DE APRESENTAÇÃO: 19-FEB-1992
- (viii) INFORMAÇÃO SOBRE REPRESENTANTE/AGENTE:
 - (A) NOME: April Logan
 - (B) NÚMERO DE REGISTO: 33,950
 - (C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/PROCESSO: SEQ0002P

(ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:

- (A) TELEFONE: (619) 554-2937
- (B) TELEFAX: (619) 554-6312

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

CCACCATGGC CGTCATGGCG CCC 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

GGTCACACTT TACAAGCTCT GAG 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3:

CCACCATGCT GGTCATGGCG CCC 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:4:
GGACTCGATG TGAGAGACAC ATC 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv). ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:
CCACCATGCG GGTCATGGCG CCC 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:
GGTCAGGCTT TACAAGCGAT GAG 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:7:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:7:
CCACCATGCG GGTAGATGCC CTC 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:8:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:8:
GGTTACAAGC TGTGAGACTC AGA 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:9:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:9:
CCACCATGGC GCCCGAAGC CTC 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:10:
GGTCACACTT TATTAGCTGT GAG 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:11:
CCACCATGGC GCCCCGAACC CTC 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:12:
GGTCACAATT TACAAGCCGA GAG 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:13:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 427 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADEIA: dupla
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:13:

AAATCGTTGC AGGACAGGAT GTGGTCCCG ATGTGACTAG CTCTTGCTG CAGGCCGTCC 60

TATCCTCTGG TTCGATAAG AGACCCAGAA CTCGGGCCCC CCACGGCCCA CCGCCACCCC 120

CATACATATG TGGTACGCAA GTAAGAGTGC CTGCGCATGC CCCATGTGCC CCACCAAGAG 180

TTTTGCATCC CATAAAGTC CCCAAAGTGG AGAACCGAAC CAATTCTTCG CGGGCAGAAC 240

AAAAGCTTCT GCACACGTCT CCACTCGAAT TTGAGCCGG CCGGCGTGTG CAAAAGAGGT 300

GAATCGAAGC AAAGACCCGT GTGTAAAGCC GCGTTTCAA AATGTATAAA ACCGAGAGCA 360

TCTGGCCAAT GTGCATCAGT TGTGGTCAGC AGCAAAATGA AGTGAATCAT CTCAGTGCAA 420

CTAAAGG 427

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:14:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 740 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADEIA: dupla
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:14:

ATTCGATGCA CACTCACATT CTTCTCCTAA TACGATAATA AACTTTTCCA TGAAAAATAT	60
GGAAAAATAT ATGAAAATTG AGAAATCCAA AAAACTGATA AACGCTCTAC TTAATTAAAA	120
TAGATAAATG GGAGCGGCTG GAATGGCGGA GCATGACCAA GTTCTCCGC CAATCAGTGG	180
TAAACAGAA GTCGTGAAA GCGGATAGAA AGAATGTTGG ATTGACGGG CAAGCATGTC	240
TGCTATGTGG CGGATGCGG AGGAATTGCA CTGGAGACCA GCAAGGTICT CATGACCAAG	300
AATATAGCGG TGTGAGTGG CCGGAAGCTC GCTTCTGTC CAGATCGAAC TCAAACTAG	360
TCCAGCCAGT CGCTGTCGAA ACTAATTAAG TTAATGAGTT TTTGATGTTA GTTTCGGCT	420
GAGCAACAAT TAAGTTTATG TTTGAGTTC GCTTAGATT CGCTGAAGGA CTGCCACTT	480
TCAATCAATA CTTTGAACA AAATCAAAC TCATTCTAAT AGCTTGGTGT TCATCTTTT	540
TTTTAATGAT AAGCATTITG TCGTTTATAC TTTTATATT TCGATATFAA ACCACCTATG	600
AAGTTCATT TAATCGCCAG ATAAGCAATA TATTCTGTAA ATATTTGTAT TCTTTATCAG	660
GAAATTCAGG GAGACGGGGA AGTACTATC TACTAAAAGC CAAACAATTT CTTACAGTT	720
TACTCTCTCT ACTCTAGAGT	740

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:15:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 60 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:15:

GCTTGGATCC AGATCTACCA TGTCTCGCTC CGTGGCCTTA GCTGTGCTCG CGCTACTCTC 60

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 36 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO : NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:16:
GGATCCGGAT GGTTACATGT CGCGATCCCA CTTAAC 36

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:17:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 19 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:17:
GGAGCCGTGA CTGACTGAG 19

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:18:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 24 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:18:
CCCTCGGCAC TGACTGACTC CTAG 24

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:19:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 26 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:19:
GCGGATCCAT GGCCGTCATG GCGCCC 26

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:20:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 29 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:20:
CGGAATTCTC ATCAGGGCTT CGGCAGCCC 29

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:21:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 38 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:21:
GGATCCTCTC AGACCCGAG ATGCGGGTCA CGGCGCCC 38

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:22:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 52 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv). ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 22:
AGCTTGAGCA CTTGTTCTTT TTGCAGAAGC TCAGAATAAA CGCTCAACTT TG 52

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:25:

Ala Ser Asn¹ Glu Asn Met Glu Thr Met
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:26:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 14 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:26:

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

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:27:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 14 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:27:

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

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:28:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NÃO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NÃO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:28:

Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:29:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) TIPO DE CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NÃO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NÃO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:29:

Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:30:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) TIPO DE CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NÃO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NÃO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:30:

Phe Arg Ile Gly Cys Arg His Ser Arg
1 5

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:33:

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

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:34:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 32 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:34:

ATATGGATCC TCACCATCTC AGGGTGAGGG GC 32

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:35:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 10 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:35:

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

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:36 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:36:

Phe Ala Pro Gly Asn Tyr Pro Ala Leu
1 5

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> The Scripps Research Institute

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

<130> SJK/FP6048722

<140> EP 02014141.2

<141> 2002-06-25

<150> EP 93906141.2

<151> 1993-02-18

<150> US 7/841,662

<151> 1992-02-19

<160> 45

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 1

ccaccatggc cgtcatggcg ccc 23

<210> 2

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 2

ggtcacactt tacaagctct gag 23

<210> 3

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 3
ccaccatgct ggtcatggcg ccc 23

<210> 4
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 4
ggactc gatg tgagagacac atc 23

<210> 5
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 5
ccaccatg cg ggtcatggcg ccc 23

<210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 6
ggtcaggc tt tacaagcgat gag 23

<210> 7
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 7
ccaccatg cg ggtagatgcc ctcc 24

<210> 8
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 8
ggttacaagc tgtgagactc aga 23

<210> 9
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 9
ccaccatggc gccccgaagc cte 23

<210> 10
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 10
ggtcacactt tattagctgt gaga 24

<210> 11
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 11
ccaccatggc gccccgaacc ctc 23

<210> 12
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 12
ggtcacaatt tacaagccga gag 23

<210> 13
<211> 427
<212> ADN
<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 13

```

aattcgttgc aggacaggat gtggtgccg atgtgactag ctctttgctg caggccgtcc 60
tatcctctg ttcgataag agaccagaa ctccggcccc ccaccgcca cggccacccc 120
catacatatg tggtagcaa gtaagagtgc ctgctgatgc cccatgtgcc ccaccaagag 180
ttttgcatcc catacaagtc cccaagtgg agaaccgaac caattcttcg cgggcagAAC 240
aaaagcttct gcacacgtct ccaactogaat ttggagccgg ccggcgtgtg caaaagaggt 300
gaatcgaacg aaagaccogt gtgtaaagcc gcgtttccaa aatgtataaa accgagagca 360
tctggccaat gtgcatcagt tgtggtcagc agcaaatca agtgaatcat ctcagtgcaa 420
ctaaagg 427

```

<210> 14

<211> 740

<212> ADN

<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 14

```

atcgatgca cactcacatt cttctcctaa tacgataata aaactttcca tgaaaaatat 60
ggaaaaatat atgaaaattg agaaatocaa aaaaotgata aacgctctac ttaattaaaa 120
tagataaatg ggagcggctg gaatggcgga gcatgaccaa gttcctccgc caatcagtcg 180
taaacagaa gtcgtgaaa gcggatagaa agaatgttcg atttgacggg caagcatgtc 240
tgctatgtgg cggattgcgg aggaattgca ctggagacca gcaaggttct catgaccaag 300
aatatagcgg tgtgagtgag cgggaagctc ggtttctgtc cagatcgaac tcaaaactag 360
tccagccagt cgctgtcgaa actaattaag ttaatgagtt tttcatgta gtttcgcgct 420

```

```

gagcaacaat taagtttatg tttcagttcg gcttagattt cgctgaagga cttgccactt 480
tcaatcaata ctttagaaca aatcaaaac tcattctaata agcttgggtg toatcttttt 540
ttttaatgat aagcattttg tcgtttatac tttttatatt tcgatattaa accacctatg 600
aagttcattt taatcgcag ataagcaata tattgtgtaa atattgtat tctttatcag 660
gaaattcagg gagcgggga agttactatc tactaaaagc caacaattt cttacagttt 720
tactctctct actctagagt 740

```

<210> 15

<211> 60

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 15

```

gcttggatcc agatctacca tgtctcgtc cgtggcetta gctgtgctcg cgtactctc 60

```

<210> 16

<211> 36

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 16
ggatccggat ggttacatgt cgcgatccca cttaac 36

<210> 17
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 17
ggagccgtga ctgactgag 19

<210> 18
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 18
ccctcggcac tgactgactc ctag 24

<210> 19
<211> 26
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 19
gcggatccat ggccgcatg gcgccc 26

<210> 20
<211> 29
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 20
cggaattctc atcagggctt cggcagccc 29

<210> 21
<211> 38
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: HLA B27 sol ADNc

<400> 21
ggatcctctc agacgccgag atgcgggtca cggcgccc 38

<210> 22
<211> 52
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 22
agcttgagca cttgttcttt ttgcagaagc tcagaataaa cgctcaactt tg 52

<210> 23
<211> 24
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 23
Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr
1 5 10 15
Ser Ser Asn Val Met Glu Glu Arg
20

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 24
Asp Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
1 5 10

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 25
Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met
1 5

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 26

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

1 5 10

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 27

Asp Ser Ser Gly Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Cys Thr Lys

1 5 10

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 28

Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 29

Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 30

Phe Arg Ile Gly Cys Arg His Ser Arg

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 31

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val

1 5

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 32

Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val

1 5 10

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 33

Leu Pro Asp Cys Lys Val Met Val His Asp Pro Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 34

<211> 32

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador de ADN

<400> 34

atatggatcc tcaccatctc agggtgaggg gc 32

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 35
Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu Lys Ser
1 5 10

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 36
Phe Ala Pro Gly Asn Tyr Pro Ala Leu
1 5

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 37
Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 38
Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 39

Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5 10

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 40

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr

1 5

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 41

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu

1 5 10

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 42

Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu

1 5

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 43

Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 44

Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
1 5

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 45

Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met
1 5

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

- (i) REQUERENTE: Per A Peterson,
Michael Jackson,
Pierre Lenglade-Demoyen,
- (ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: ATIVAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS T
CITOTÓXICAS
- (iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 36
- (iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:
 - (A) DESTINATÁRIO: The Scripps Research Institute
 - (B) RUA: 10666 North Torrey Pines Road, TPC 8
 - (C) CIDADE: La Jolla
 - (D) ESTADO: California
 - (E) PAÍS: USA
 - (F) ZIP: 92037

- (v) FORMATO LEGÍVEL EM COMPUTADOR:
 - (A) TIPO DE MEIO: Disquete
 - (B) COMPUTADOR: PC compatível com IBM
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) *SOFTWARE*: PatentIn Release #1.0. Versão #1.25
- (vi) DADOS DO PRESENTE PEDIDO:
 - (A) NÚMERO DO PEDIDO: PCT/US93/
 - (B) DATA DE APRESENTAÇÃO: 18-FEB-1993
 - (C) CLASSIFICAÇÃO:
- (vii) DADOS DE PEDIDO ANTERIOR:
 - (A) NÚMERO DO PEDIDO: 07/841,662
 - (B) DATA DE APRESENTAÇÃO: 19-FEB-1992
- (viii) INFORMAÇÃO SOBRE REPRESENTANTE/AGENTE:
 - (A) NOME: April Logan
 - (B) NÚMERO DE REGISTO: 33,950
 - (C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/PROCESSO: SEQ0002P
- (ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:
 - (A) TELEFONE: (619) 554-2937
 - (B) TELEFAX: (619) 554-6312

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NÃO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:
CCACCATGGC CGTCATGGCG CCC 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:
GGTCACACTT TACAAGCTCT GAG 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3:
CCACCATGCT GGTCATGGCG CCC 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:4:
GGACTCGATG TGAGAGACAC ATC 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv). ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:
CCACCATGCG GGTCATGGCG CCC 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:6:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:
GGTCAGGCTT TACAAGCGAT GAG 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:7:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:7:
CCACCATGCG GGTAGATGCC CTC 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:8:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 8:
GGTTACAAGC TGTGAGACTC AGA 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:9:
CCACCATGGC GCCCCGAAGC CTC 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:10:
GGTCACACTT TATTAGCTGT GAG 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:11:
CCACCATGGC GCCCCGAACC CTC 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:12:

GGTCACAATT TACAAGCCGA GAG 23

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 427 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:13:

```

AATTGGTTGC AGGACAGGAT GTGGTGCCCG ATGTGACTAG CTCTTTGCTG CAGGCCGTCC 60
TATCCTCTGG TTCGATAAG AGACCCAGAA CTCGGGCCCC CCACGGCCCA CCGGCACCCC 120
CATACATATG TGGTACGCAA GTAAGAGTGC CTGGCATGC CCCATGTGCC CCACCAAGAG 180

TTTTGCATCC CATACAAGTC CCCAAAGTGG AGAACCGAAC CAATCTTTCG CGGGCAGAAC 240
AAAAGCTTCT GCACACGTCT CCACTCGAAT TTGGAGCCCG CCGGCGTGTG CAAAAGAGGT 300
GAATCGAAGC AAAGACCCGT GTGTAAAGCC GCGTTTCCAA AATGTATAAA ACCGAGAGCA 360
TCTGGCCAAT GTGCATCAGT TGTGGTCAGC AGCAAAATCA AGTGAATCAT CTCAGTGCAA 420
CTAAAGG 427

```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 740 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:14:

```

ATTGATGCA CACTCACATT CTTCTCCTAA TACGATAATA AAAC TTTC A TGAAAAATAT   60
GGAAAAATAT ATGAAAATTG AGAAATCAA AAAACTGATA AAGGCTCTAC TTAATTA AAA   120
TAGATAAATG GGAGCGGCTG GAATGGCGGA GCATGACCAA GTTCCTCCGC CAATCAGTCG   180
TAAACAGAA GTCGTGGA A GCGGATAGAA AGAATGTTCG ATTTGACGGG CAAGCATGTC   240
TGCTATGTGG CGGATTGCGG AGGAATTGCA CTGGAGACCA GCAAGTTTCT CATGACCAAG   300
AATATAGCGG TGTGAGTGAG CGGGAAGCTC GCTTCTCTGC CAGATCGAAC TCAAACTAG   360
TCGAGCCAGT CGCTGTGGA ACTAATTAAG TTAATGAGTT TTTCAITTA GTTTGCGGCT   420
GAGCAACAAT TAAGTTTATG TTTCACTTCG GCTTAGATTT CGCTGAAGGA CTTGCCACTT   480
TCAATCAATA CTTTAGAACA AAATCAAAC TCATTCTAAT AGCTTGGTGT TCATCTTTT   540
TTTTAATGAT AAGCATTTTG TCGTTTATAC TTTTATATT TCGATATTA ACCACCTATG   600
AAGTTCATTT TAATCGCCAG ATAAGCAATA TATGTGTAA ATATTTGTAT TCTTTATCAG   660
GAAATTCAGG GAGACGGGGA AGTTACTATC TACTAAAAGC CAAACAATTT CTTACAGTTT   720

TACTCTCTCT ACTCTAGAGT   740

```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 60 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:15:

GCTTGGATCC AGATCTACCA TGTCTCGCTC CGTGGCCTTA GCTGTGCTCG CGCTACTCTC 60

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 36 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:16:
GGATCCGGAT GGTACATGT CGCGATCCCA CTTAAC 36

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 19 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:17:
GGAGCCGTGA CTGACTGAG 19

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:18:
CCCTCGGCAC TGACTGACTC CTAG 24

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:19:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:19:
GCGGATCCAT GGCCGTCATG GCGCCC 26

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:20:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 29 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:20:
CGGAATTCTC ATCAGGGCTT CGGCAGCCC 29

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:21:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 38 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: dupla

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:21:
GGATCCTCTC AGACCCGAG ATGCGGGTCA CGGCGCCC 38

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:22:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 52 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de uma célula T CD8⁺ activada *in vitro*, o método compreendendo o contacto, *in vitro*, de uma célula T CD8⁺ com uma molécula do MHC de Classe I humana carregada com antigénio, expressa na superfície numa célula de insecto, durante um período de tempo suficiente para activar, de uma maneira específica do antigénio, a célula T CD8⁺.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o método compreende ainda:

- (a) a separação da célula T CD8⁺ activada da molécula do MHC de Classe I carregada com antigénio; e
- (b) a suspensão da célula T CD8⁺ activada num transportador ou excipiente aceitáveis.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que a célula de insecto é uma célula de *Drosophila*.

4. Método de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que a célula de insecto é uma célula de larvas de traça.

5. Método de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que a célula de insecto é uma célula de traça, bicho da seda ou mosquito.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a célula T CD8⁺ é de um ser humano.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a célula T CD8⁺ compreende um gene do MHC de Classe I humano sob o controlo de um promotor indutível, e um gene de microglobulina- β 2 humana, que pode ser expresso.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que as moléculas do MHC de Classe I vazias são expressas na superfície na célula de insecto e a célula de insecto é colocada em contacto com um péptido antigénico.

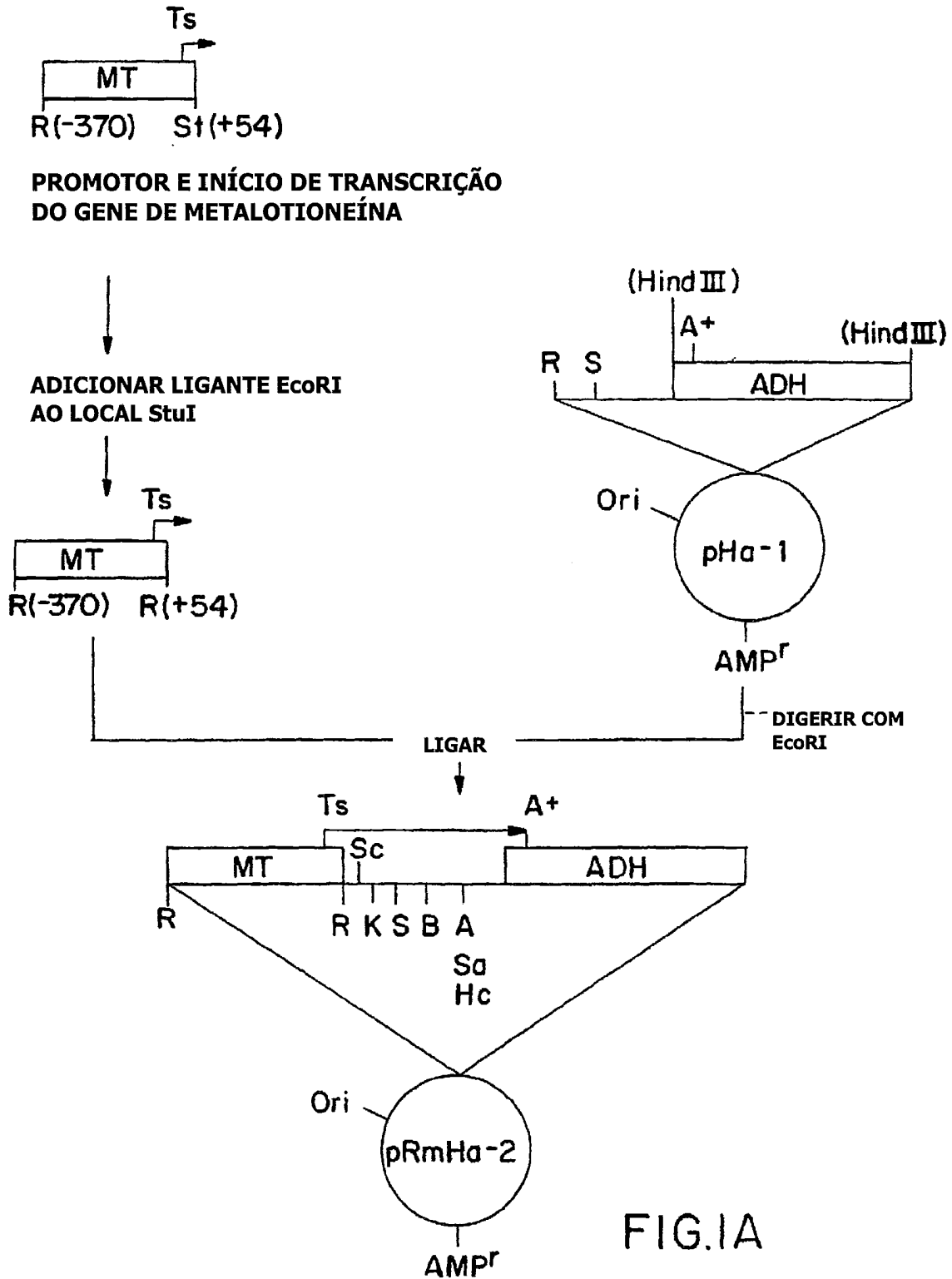
9. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o promotor indutível é um promotor de metalotioneína.

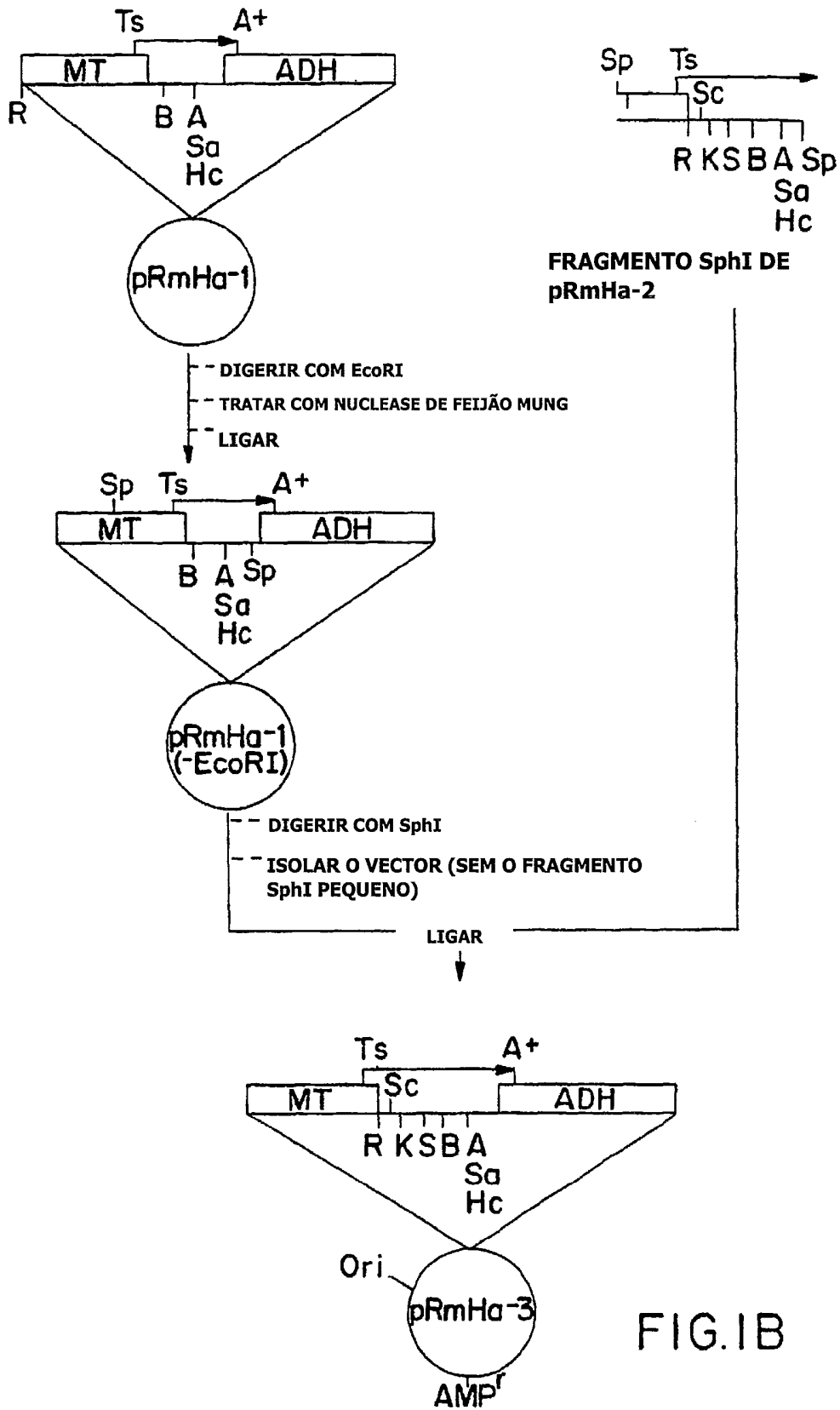
10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, em que o gene do MHC de Classe I humano e o gene de microglobulina- β 2 humano são transfectados para a linha celular de insecto.

11. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o antigénio do MHC de Classe I humano é B7, B27 ou A2.1.

12. Método de acordo com a reivindicação 8, em que o péptido é derivado de uma proteína viral.

Lisboa,





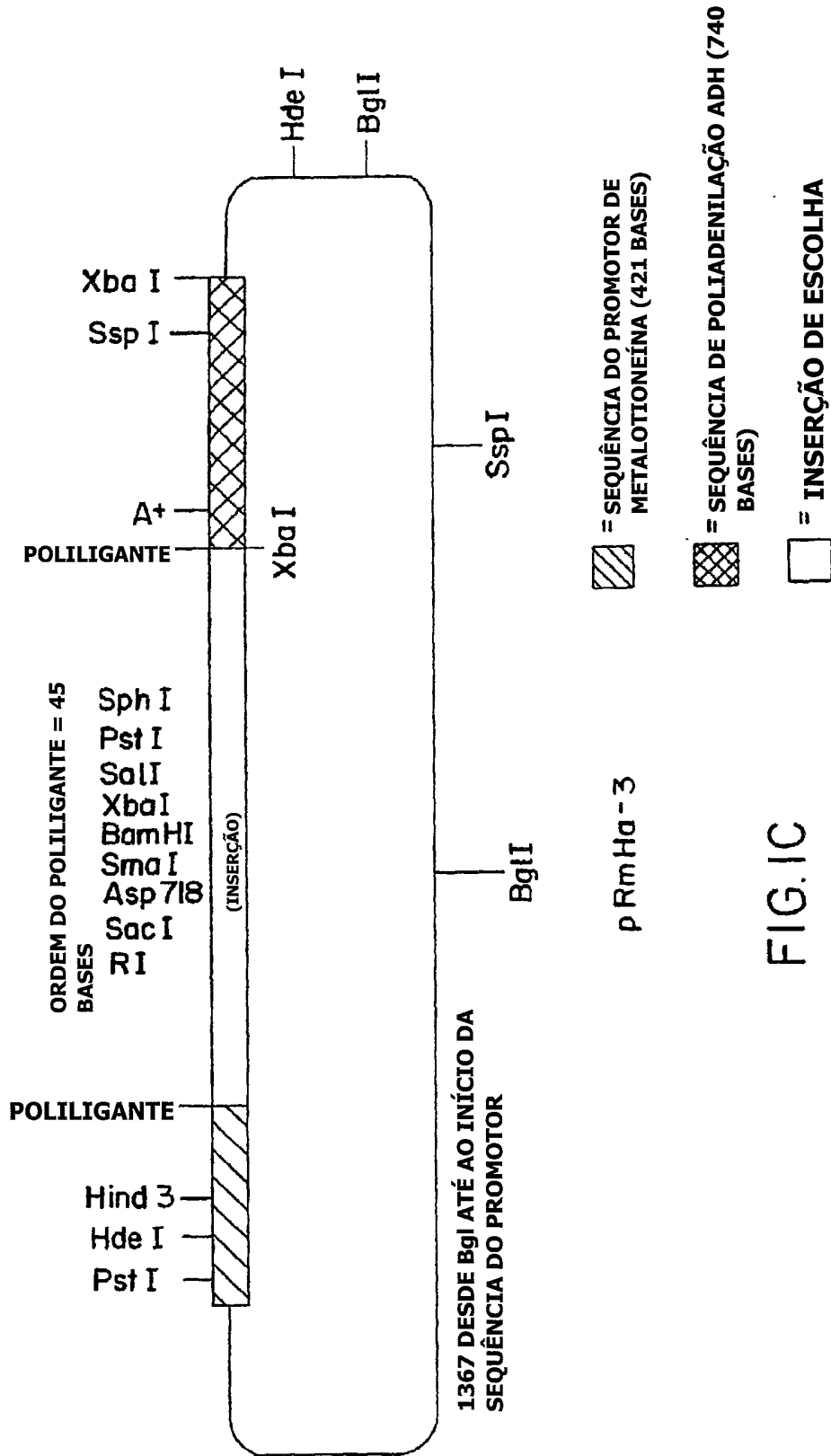


FIG.1C

Kb/mb2		Db/mb2	
ANTICORPO Y3 (ESPECÍFICO DE Kb $\alpha 1/\alpha 2$)	ANTICORPO 193 (ANTI-CAUDA CITOPLASMÁTICA Kb)	ANTICORPO B22 (ESPECÍFICO DE Db $\alpha 1/\alpha 2$)	
4°C	4°C	4°C	
37°C	37°C	37°C	
- Ova 8 NP 9 - Ova 8 NP 9 - Ova 8 NP 9 - Ova 8 NP 9	- Ova 8 NP 9 - Ova 8 NP 9 - Ova 8 NP 9 - Ova 8 NP 9	- Ova 8 NP 9 - Ova 8 NP 9 - Ova 8 NP 9	- Ova 8 NP 9

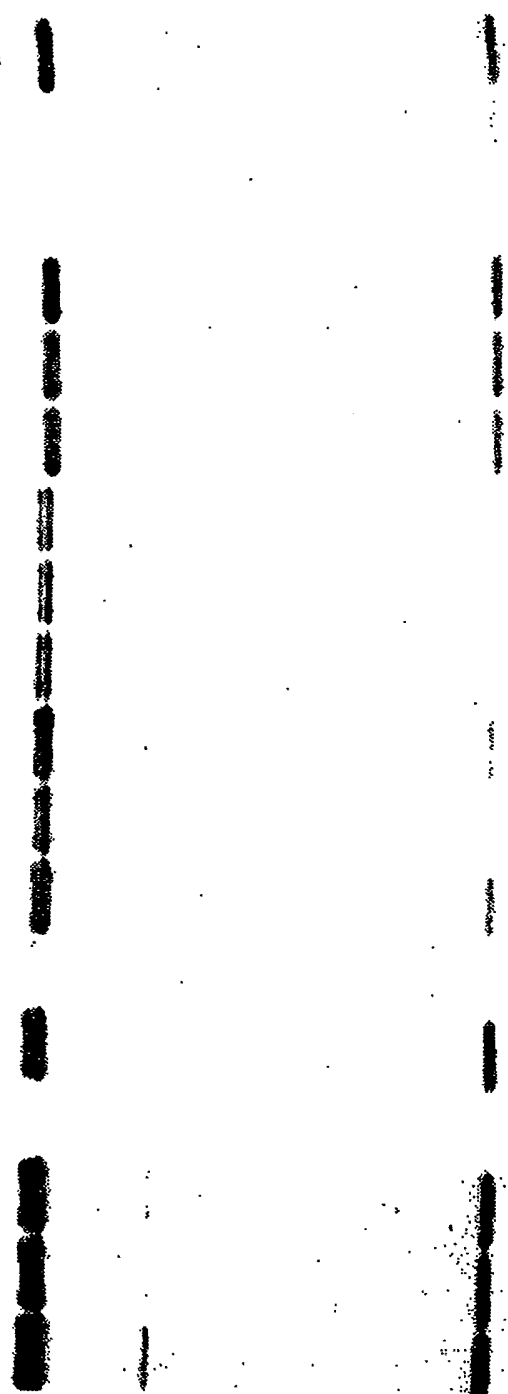


FIG.2A

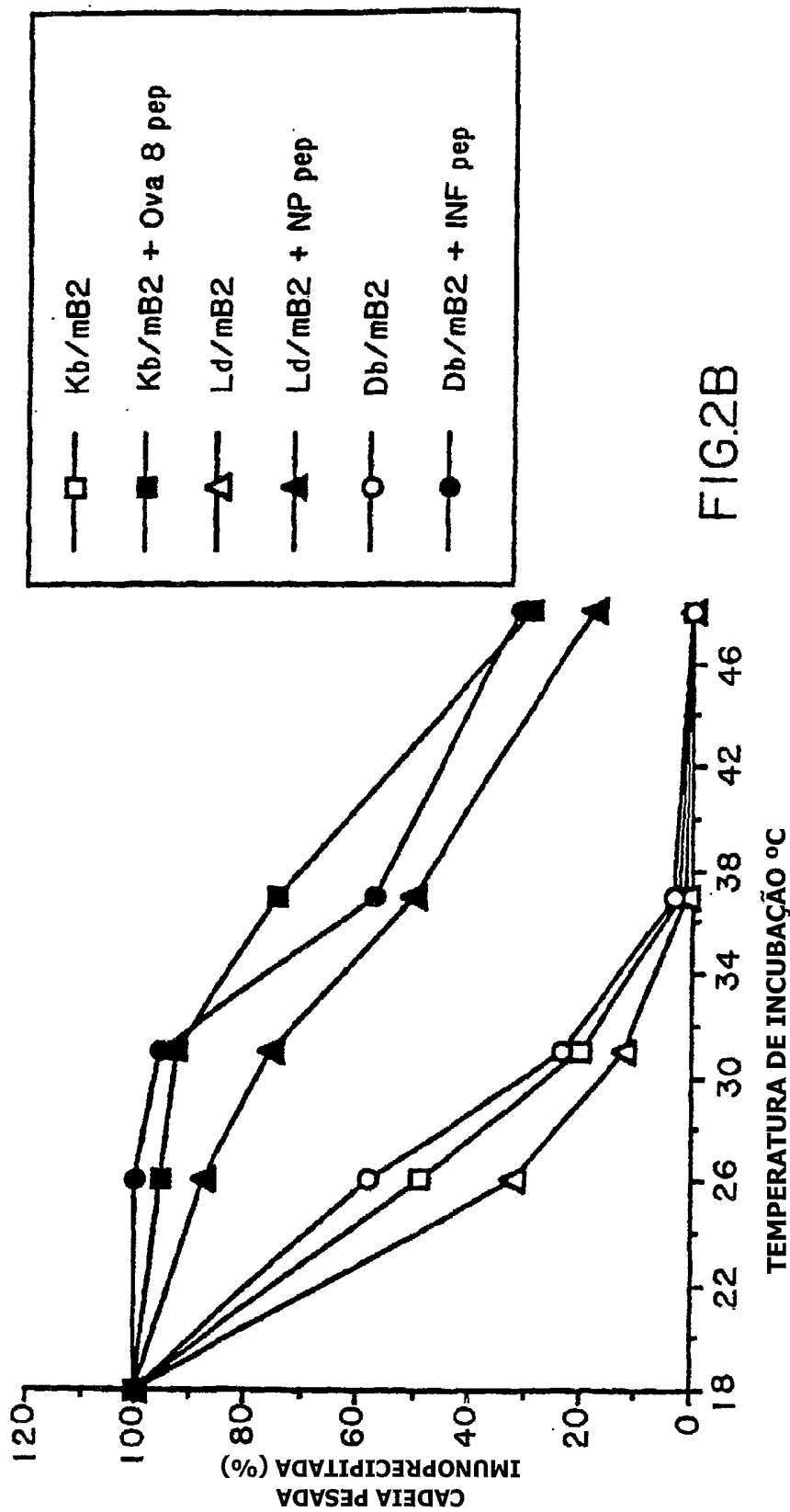


FIG.2B

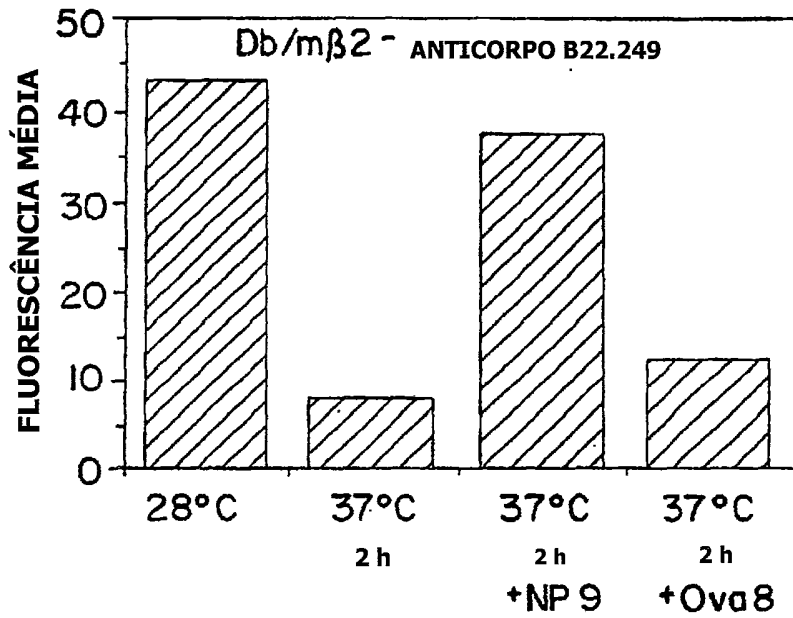


FIG.3A

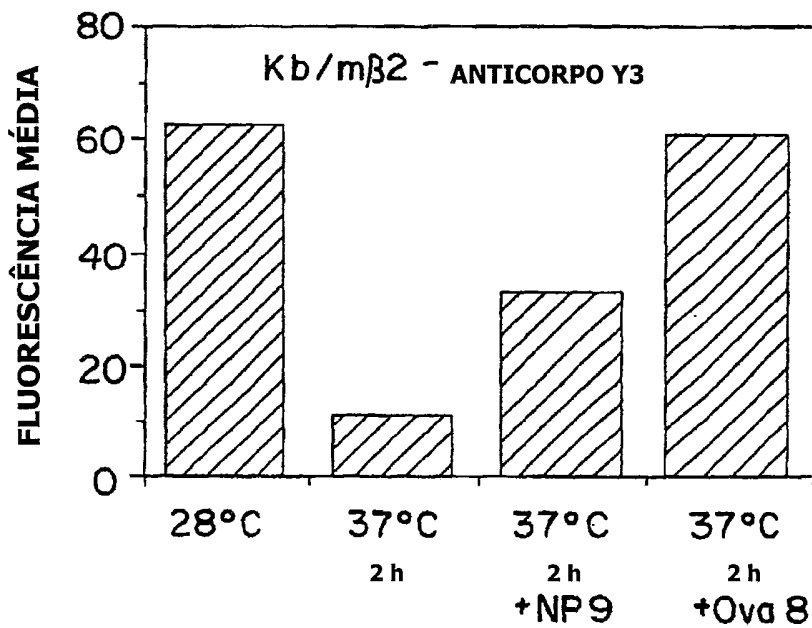
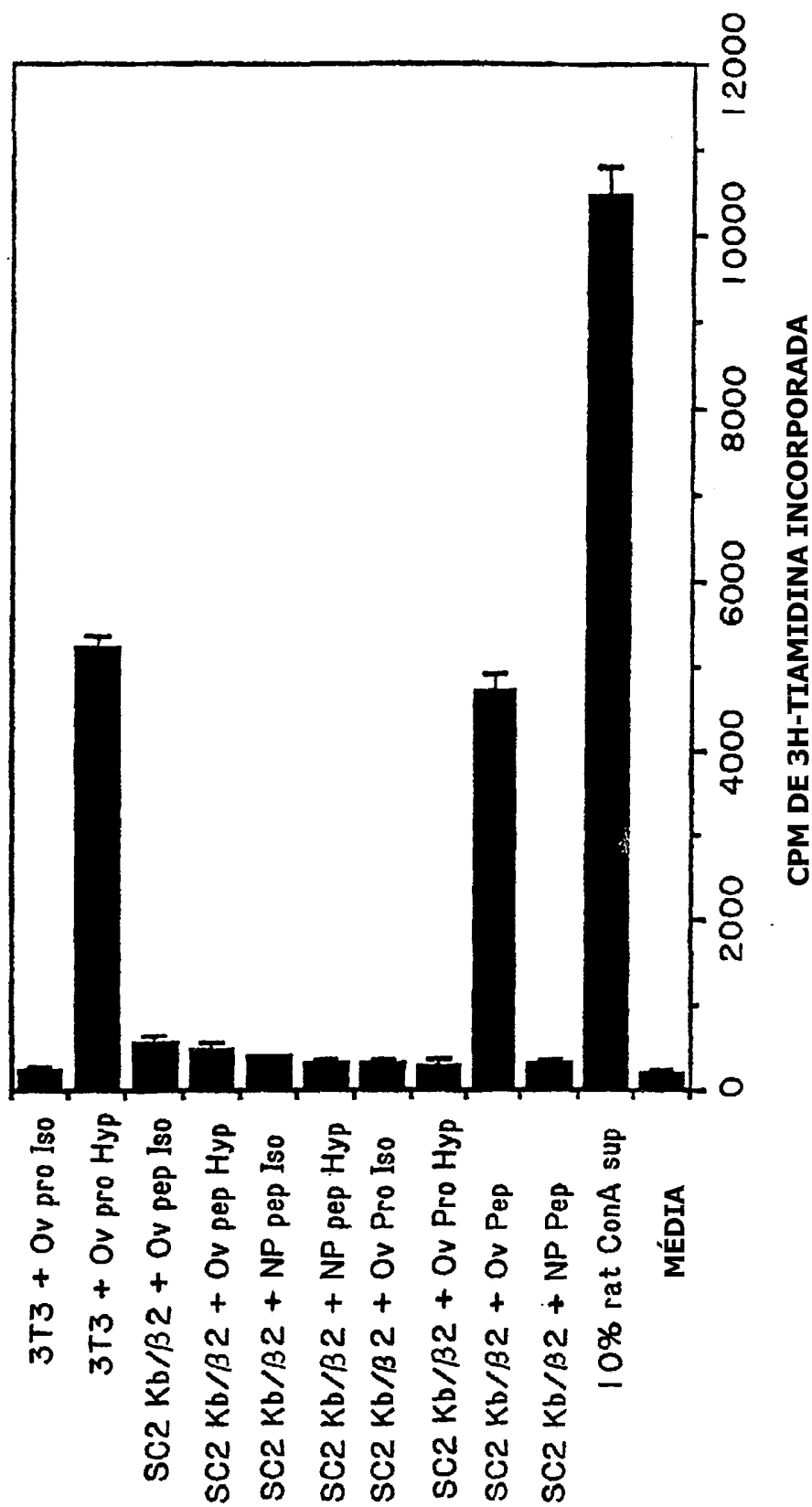


FIG.3B

FIG. 4



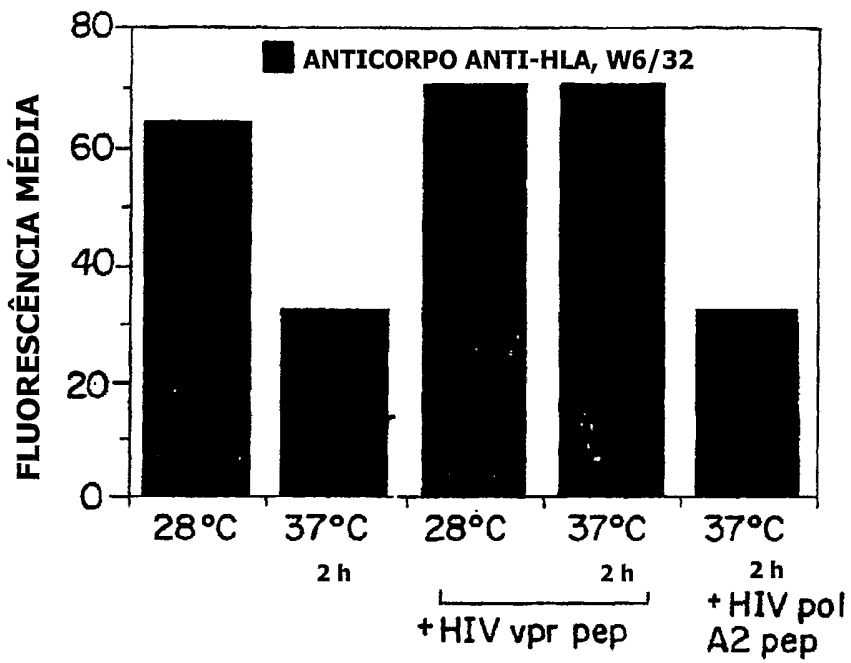


FIG.5A-1

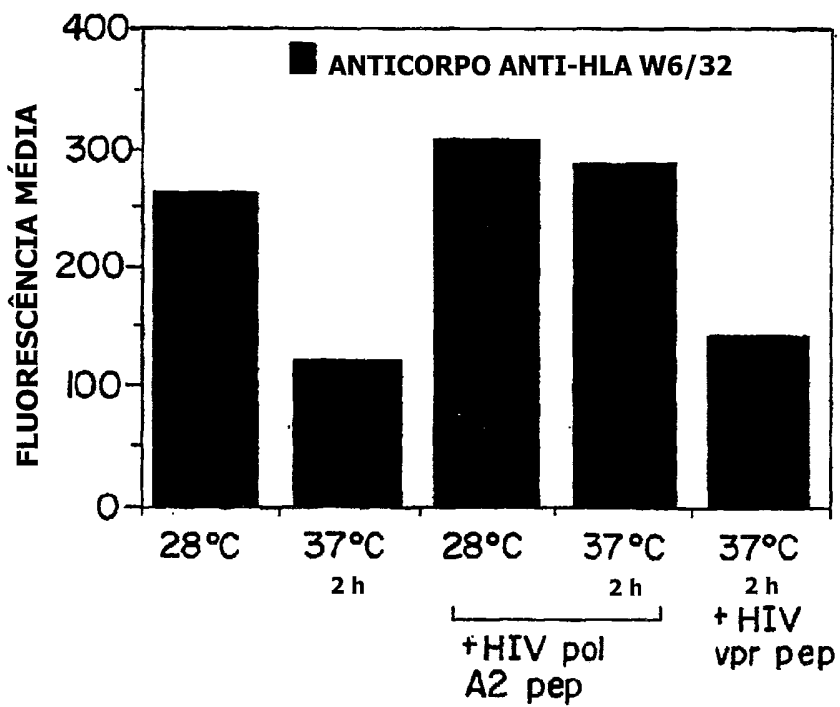


FIG.5A-2

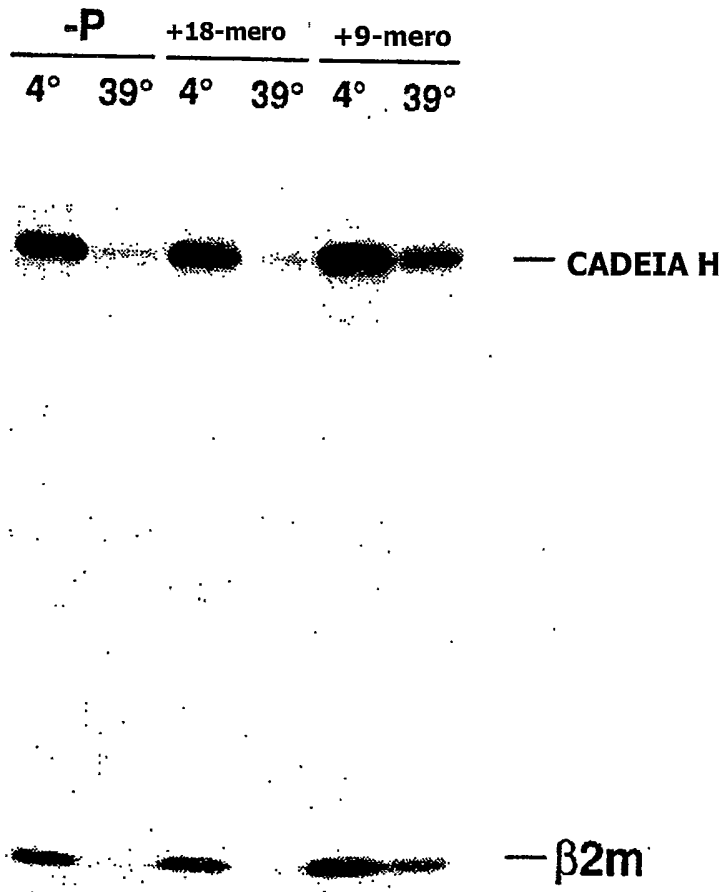


FIG. 5B

**ESTABILIZAÇÃO DE HLA A2.2 EM LISADOS
OBTIDOS COM TRITON X100, PELO PÉPTIDO**

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

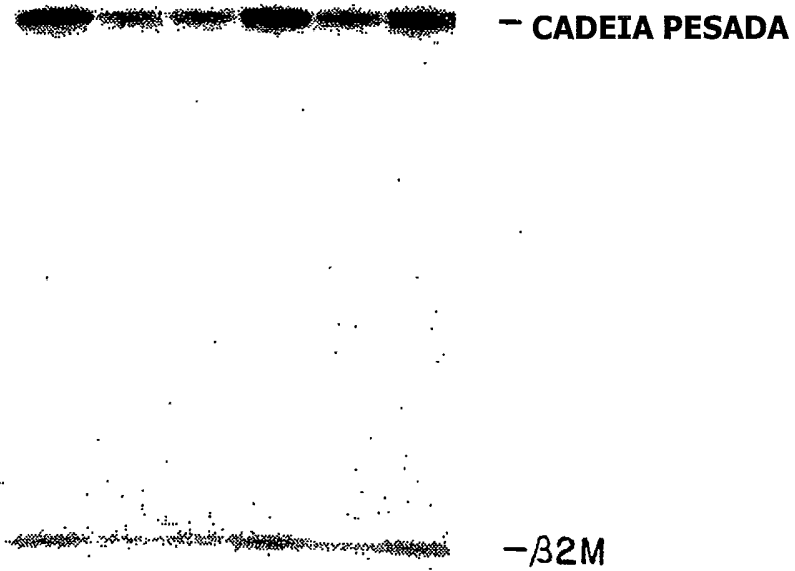
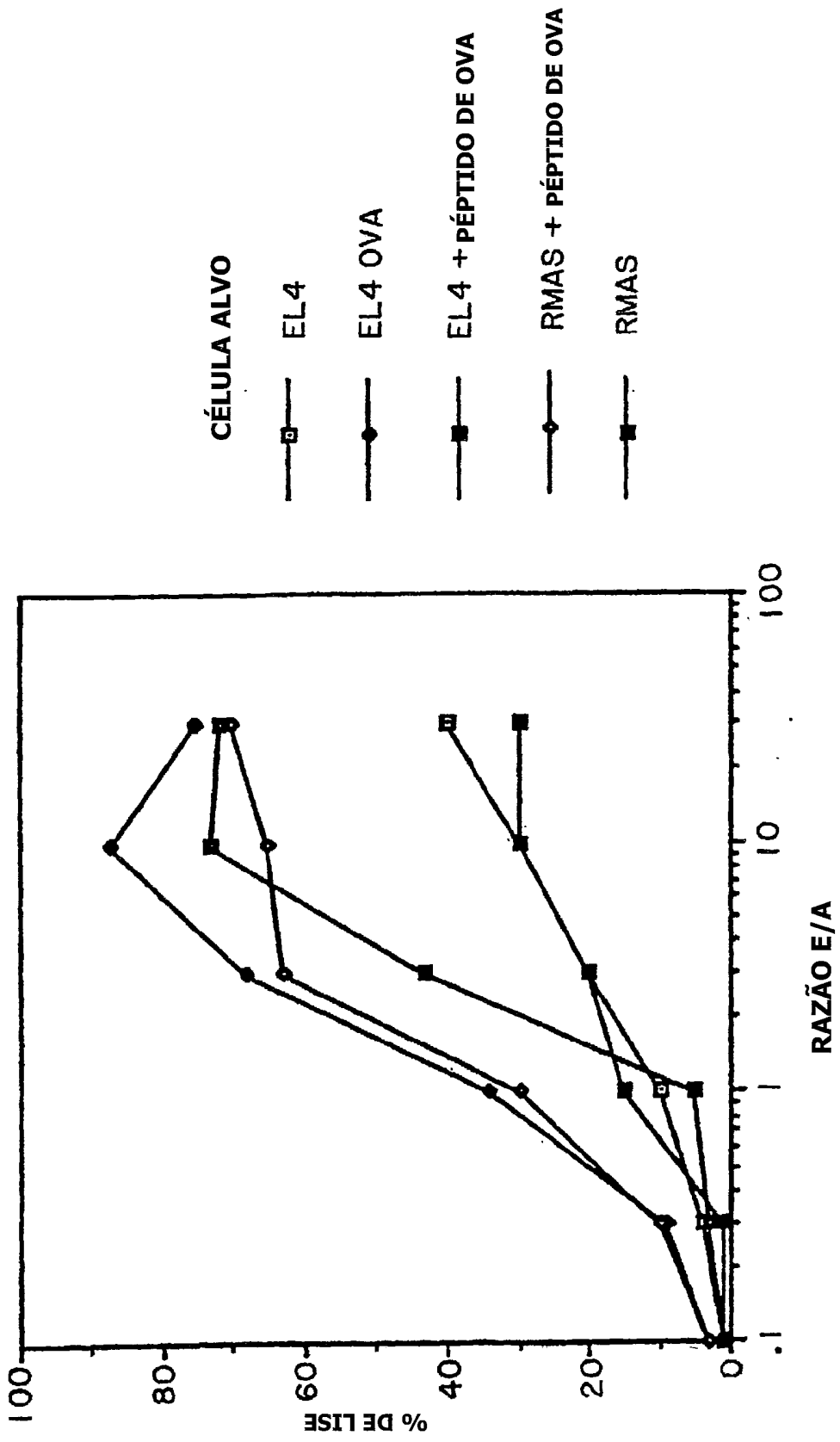
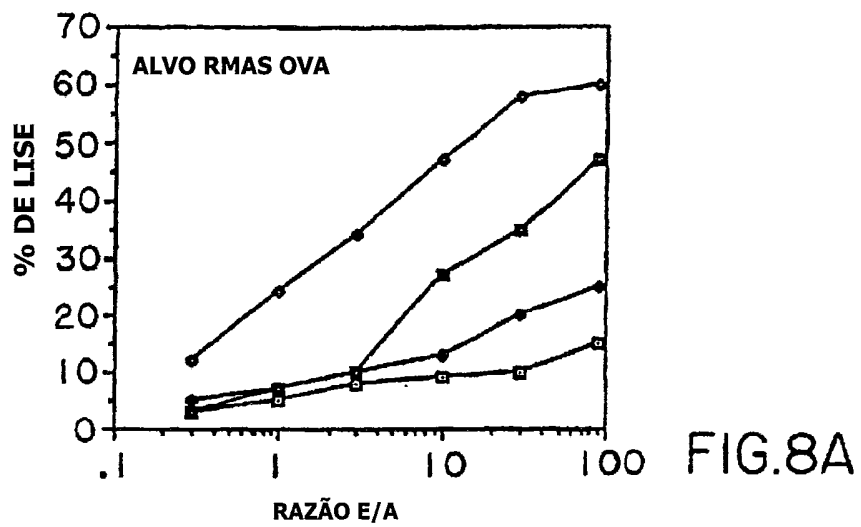


FIG.5C

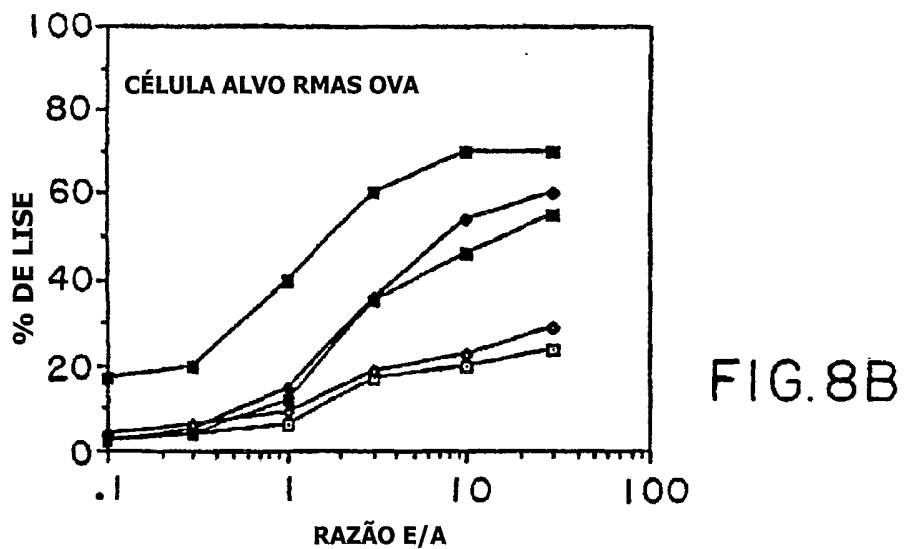
FIG.7





CÉLULA ESTIMULADORA DE MOSCA

- KB
- KB OVA FIXADA
- KB OVA FIXADA + S/N
- KB OVA



CÉLULA ESTIMULADORA DE MOSCA

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

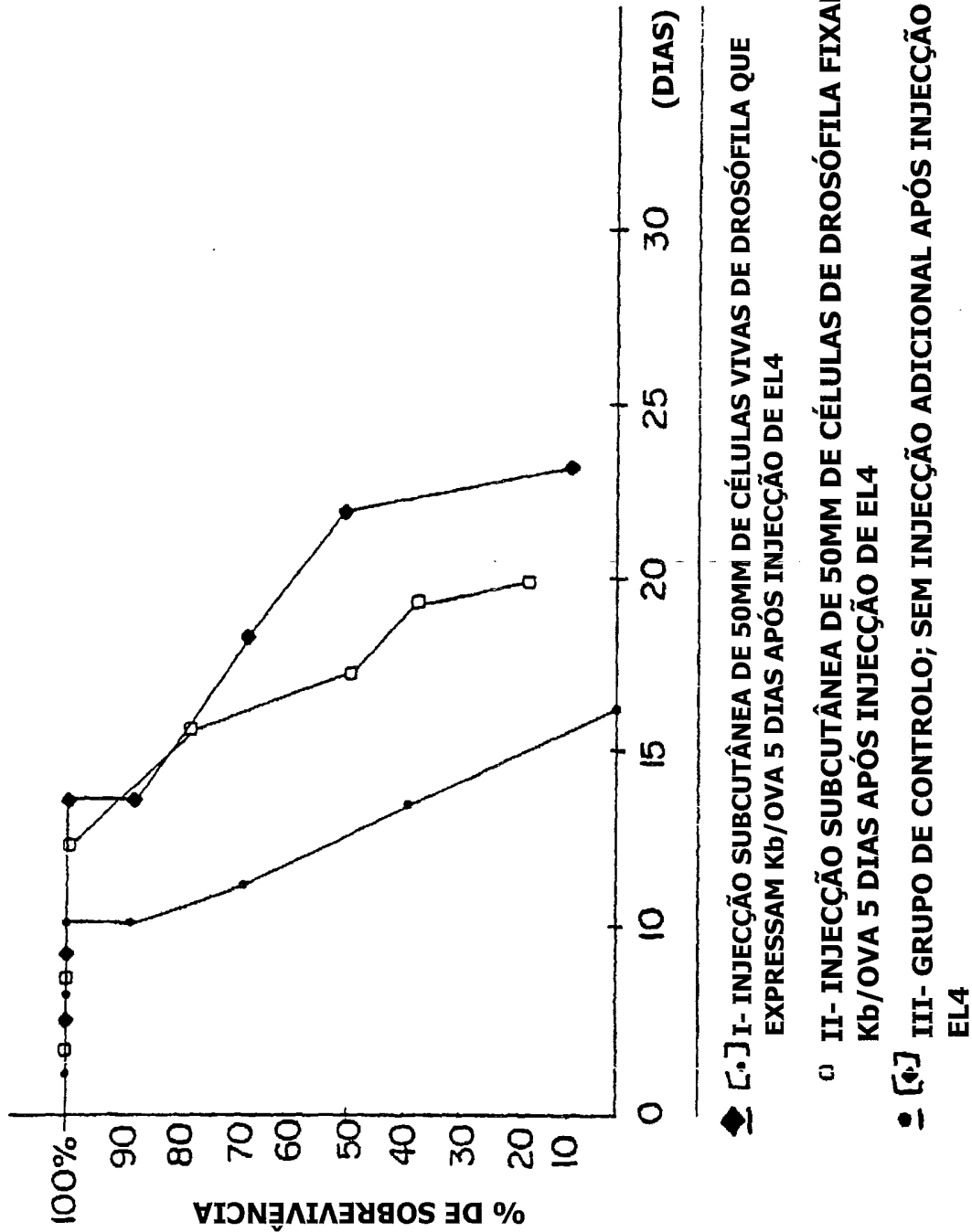
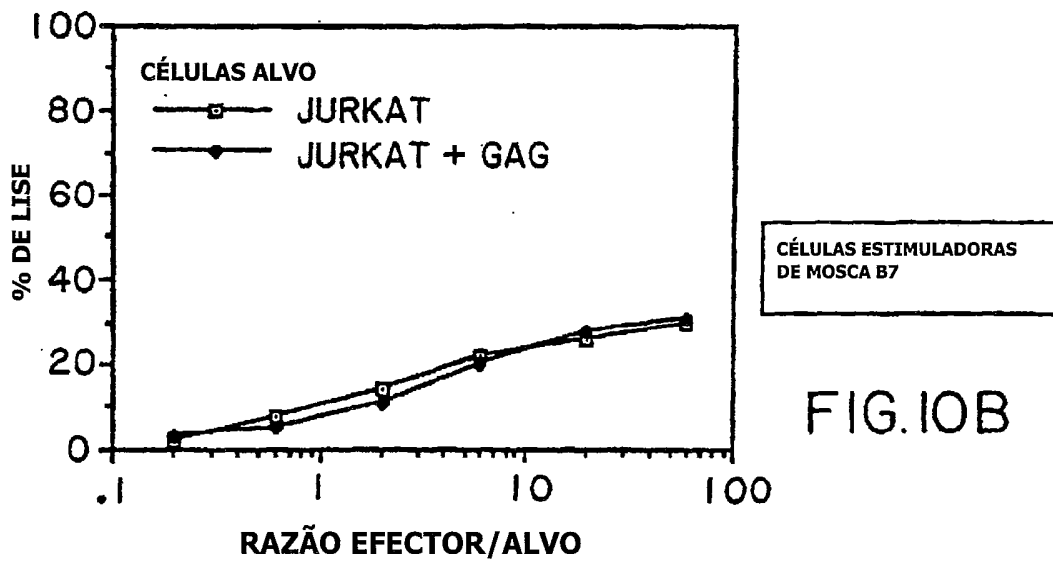
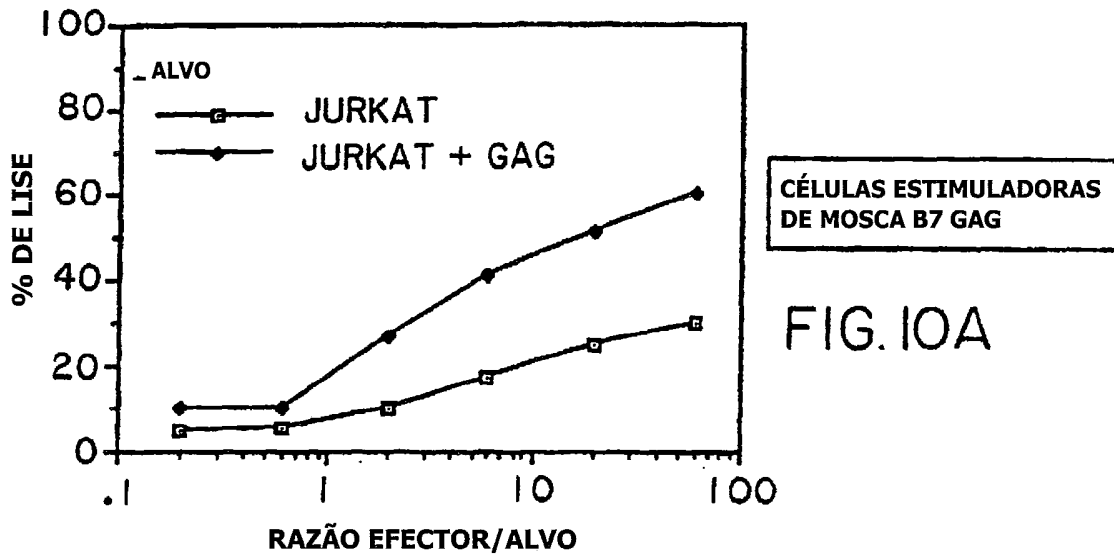


FIG.9



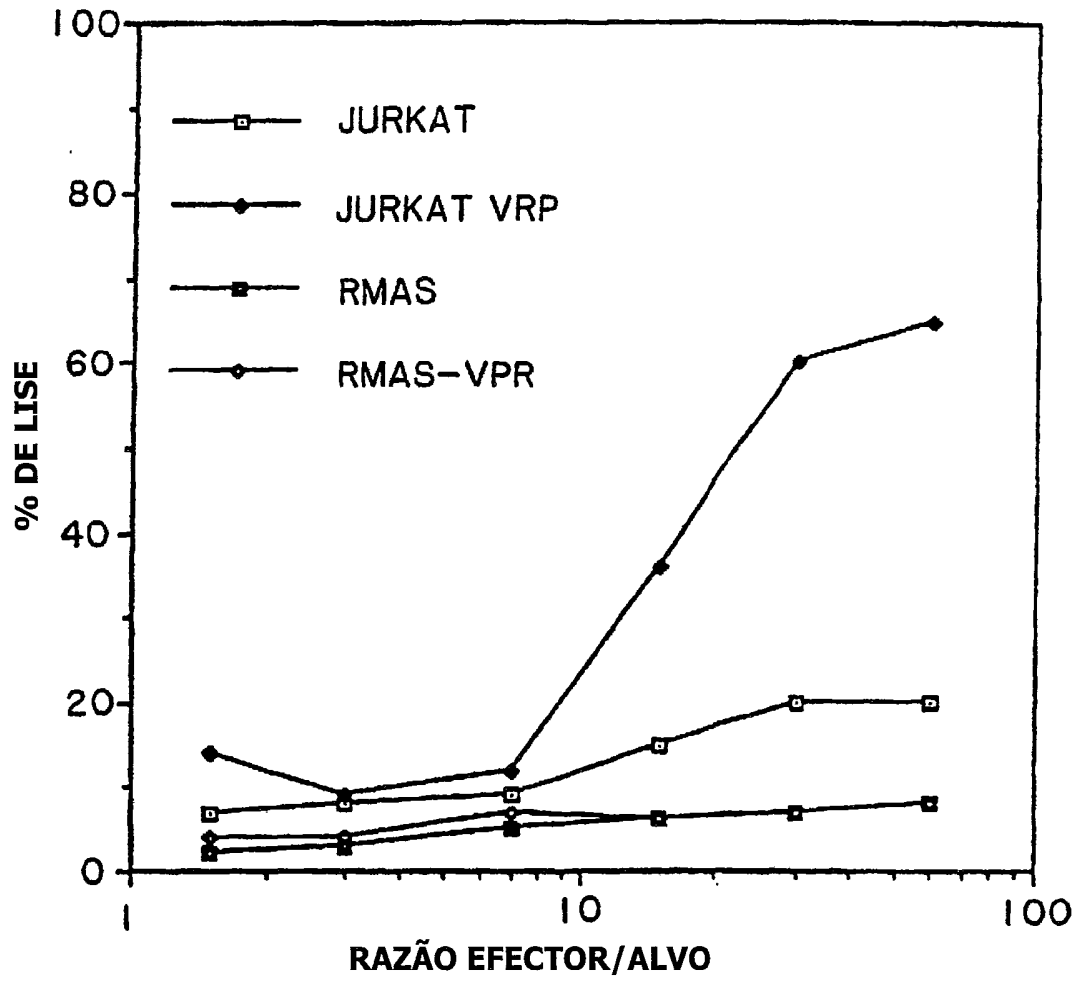


FIG.10C

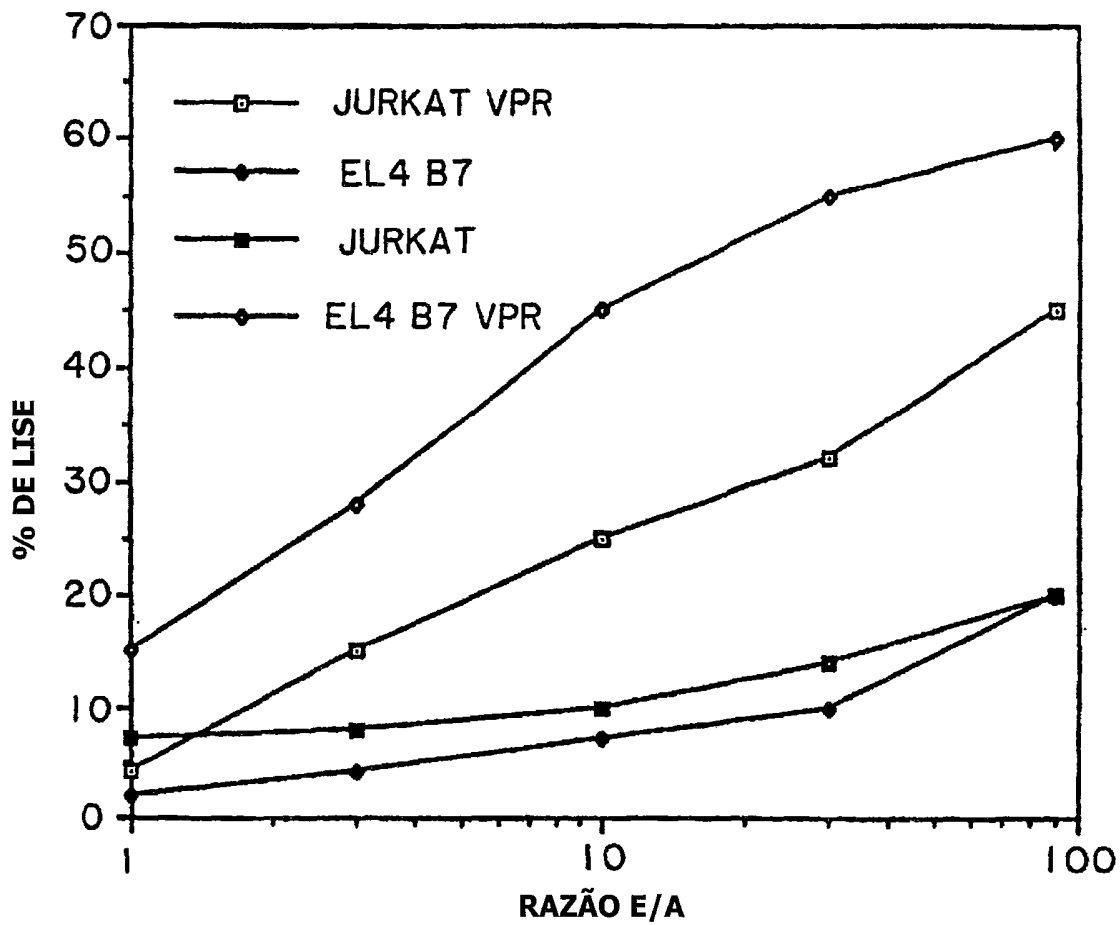


FIG.IIA

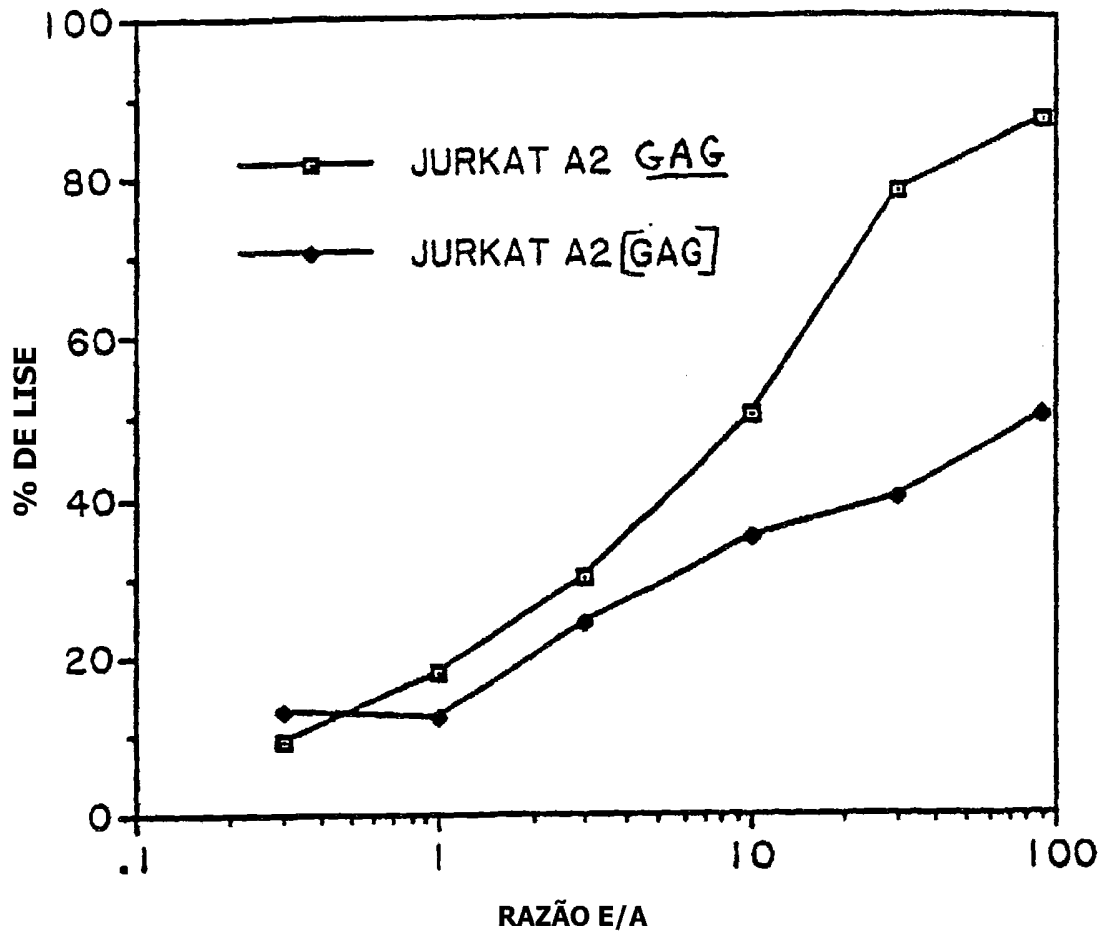


FIG. IIB

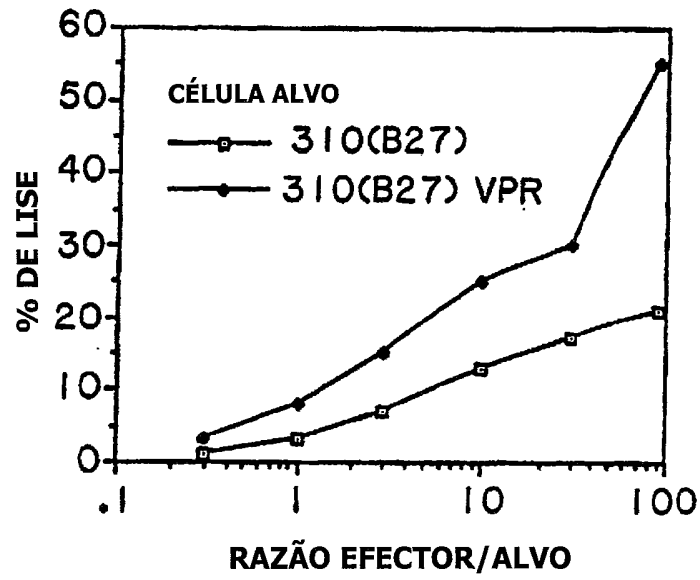


FIG. IIC

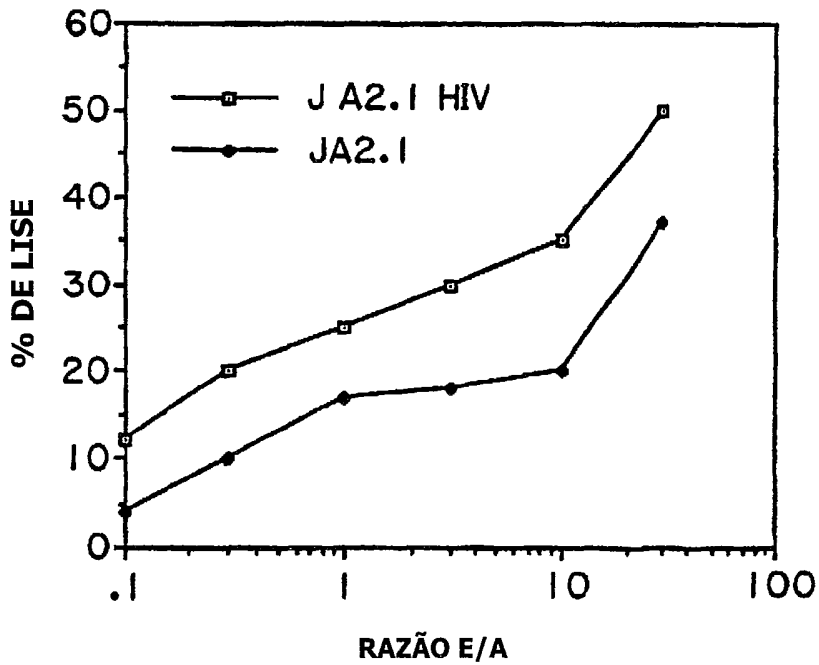


FIG. I2